

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**CONTROL POBLACIONAL Y OSCILATORIO UTILIZANDO EL**  
***Quorum sensing* DE *Staphylococcus aureus* MEDIANTE UN**  
**CIRCUITO GENÉTICO DE *Escherichia coli***

**Por**

**M.C. DIEGO FRANCISCO BENÍTEZ CHAO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN**  
**CIENCIAS con orientación en Microbiología Aplicada**

**2021**

**Control poblacional y oscilatorio utilizando el *Quorum Sensing*  
de *Staphylococcus aureus* mediante un circuito genético de  
*Escherichia coli***

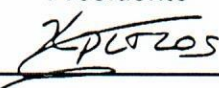
Aprobación de la Tesis:



---

**DR. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ**

Presidente



---

**DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS**

Secretario



---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Primer Vocal



---

**DR. GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ**

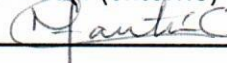
Segundo Vocal



---

**DRA. LUISA YOLANDA SOLÍS SOTO**

Tercera Vocal (externo)



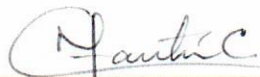
---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Sub-Directora de Posgrado

**Control poblacional y oscilatorio utilizando el *Quorum Sensing*  
de *Staphylococcus aureus* mediante un circuito genético de  
*Escherichia coli***

Revisión de la Tesis:



---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Comité tutorial



---


**DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS**

Comité tutorial

---

**DR. GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ**

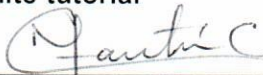
Comité tutorial



---

**DRA. LUISA YOLANDA SOLÍS SOTO**

Comité tutorial



---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

Sub-Directora de Posgrado

## RESUMEN

Diego Francisco Benítez Chao

Fecha de graduación: 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título de Estudio:** Control poblacional y oscilatorio utilizando el *Quorum Sensing* de *Staphylococcus aureus* mediante un circuito genético de *Escherichia coli*

**Número de páginas:** 156      **Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Área de estudio:** Microbiología Aplicada, Biología Sintética y Bacteriocinas.

**Propósito y Método de Estudio:** El incremento de infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) ha ganado importancia en los sistemas de salud públicos mundiales en las últimas décadas. Diversos agentes terapéuticos alternativos a los antibióticos han sido desarrollados para el tratamiento de este tipo de infecciones. Recientemente, bajo los principios de la Biología Sintética, se han habilitado células enteras que sirvan como biosensores, detectando moléculas producidas por patógenos y que como resultado, liberen una sustancia antimicrobiana que erradique al patógeno, como las bacteriocinas. Actualmente, los péptidos señales y los péptidos de fusión han sido ampliamente usados para mejorar la producción y purificación de bacteriocinas en sistemas recombinantes. En este trabajo, presentamos el diseño *in silico* que emula a *E. coli* para que actúe como biosensor al detectar moléculas de *Quorum Sensing* (QS) de MRSA productoras de señales AIP-II y que en respuesta, produzca Lacticina Q (LnqQ), una bacteriocina con antecedentes contra células MRSA. Adicionalmente, experimentamos la capacidad del péptido señal N-AmyE y el péptido de fusión SmbP para la producción heteróloga de LnqQ en el periplasma y el citoplasma de células de *E. coli*, respectivamente.

**Contribuciones y Conclusiones:** En primera instancia, se construyeron dos módulos genéticos: biosensor y de bacteriocina; ambos módulos fueron ensamblados en el plásmido Dual Biosensor-Killer. Ambos módulos fueron optimizados para su expresión en *E. coli* para incrementar el rendimiento de producción de proteínas recombinantes. El análisis predictivo del vector nos permite intuir que su efecto en las células *E. coli* las emularía para detectar moléculas de QS producidas por MRSA productoras de AIP clase II y además para producir y excretar LnqQ en función a la concentración externa al péptido autoinductor de MRSA. Los resultados predictivos abren la posibilidad de diseñar antibióticos terapéuticos

inteligentes que puedan atacar patógenos de resistencia. Con relación al péptido señal N-AmyE y al péptido de fusión SmbP, observamos que nivel predictivo ambos eran candidatos potenciales para la producción periplásmica y citoplásmica de LnqQ en células de *E. coli*, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados experimentales demostraron que la bacteriocina LnqQ no logró ser producida ni purificada cuando estuvo acoplada con N-AmyE o SmbP. Estos resultados enriquecen la literatura sobre ambas etiquetas proteicas así como también descubrimos puntos a consideración que pudieran ser importantes en afectar la producción y purificación cuando LnqQ es acoplada con diferentes etiquetas proteicas en células de *E. coli*.

**CONTROL POBLACIONAL Y OSCILATORIO UTILIZANDO EL QUORUM  
SENSING DE *Staphylococcus aureus* MEDIANTE UN CIRCUITO GENÉTICO  
DE *Escherichia coli***

**Presentado por**

**M.C. Diego Francisco Benítez Chao**

El presente proyecto fue mayormente realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la asesoría del Dr. José Rubén Morones Ramírez y en el menor medida en el Laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas, unidad perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con apoyo del Dr. Xristo Zárate Kalfópulos. Este proyecto fue auspiciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el apoyo con el Beca Nacional de Posgrado (**número de becario 289476**).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado con la Beca Nacional de Posgrado con número de becario 289476 (CVU no. 516171) para la continuación de estudios

A la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) y a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por el apoyo otorgado con la aprobación de becas y por el uso directo e indirecto de sus instalaciones, materiales y equipos.

Al Dr. José Rubén Morones Ramírez, mi asesor, a quien agradezco por la oportunidad de colaborar en el equipo de investigación Nanobiotechnology Research Group (NBR). Externo mi agradecimiento por las asesorías y el uso de instalaciones, equipos y materiales en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN), así como el financiamiento para la obtención de materiales de experimentación y ejecución de servicios y el mejoramiento de mi vida profesional.

Al M.C. Francisco de Jesús Balderas Cisneros y al Dr. Angel León Buitimea, miembros del NBR y quienes fueron clave en la elaboración de este proyecto así como en los artículos científicos redactados durante el proceso doctoral.

Al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, miembro del comité tutorial, por su apoyo técnico y asesoría por el equipo de investigación del Laboratorio de Expresión y Producción de Proteínas (PEP). El agradecimiento se extiende a David Pérez, Bryan Santos y Jessica Gómez por sus importantes contribuciones.

A los demás miembros NBR así como del comité tutorial por sus comentarios, revisiones y asesorías en la elaboración de este proyecto.

A mis padres María Guadalupe Chao Soto y Alejandro Benítez Villegas y a mi hermano Angel Alejandro Benítez Chao, por su apoyo emocional e incondicional en el transcurso de este proyecto.

## DEDICATORIA

Para Dios, ¡Gracias por el don de pensar!

Para mi mamá Lupita y mi papá Alejandro.

Para mis hermanos, Angel Alejandro y Jesús Alejandro (+).

Para mis mejores amigos, Esthela Maldonado, Ricardo “Mankis” García, Ricardo “Ciego” García, Edgar “Bombón” Villareal, Gerardo “Pepis” Villarreal, Mayela “Monkey” Maldonado, Anilú Maldonado, Eduardo Mendoza, Alejandra Villarreal, Isaac “Bebo” González, Cristy Llanes, Salma Alemán ¡Gracias por ser tan importantes para mí!

Para mis colegas del NBR, muy en especial para Paco Balderas, Angel León, Javier Garza, Paco “Negro” Rodríguez, Dago Torres, Luis Cepeda, Albert Lerma, Jordy Lerma, César Garza, Alex de la Garza, Isabel Caamal, Gricelda Mendiola, Fatemehalsadat Tabatabaeifar, Hossein Alishaharatobotni, Nahid Rafiei y otros más. Se extiende la dedicatoria a mis colegas en PEP en especial para David Pérez, Jessica Gómez, Brayan Santos, Evelyn Martínez.

Para los que fueron mis estudiantes de verano o de servicio social con mención especial para Montse Villegas, Raúl García, Cinthia Castillo, Sarai Fierros, Jessica Ojeda y otros más.

Para mis colegas de generación de doctorado, en especial para Paco Balderas, David Pérez y Gaby Quintanilla.

Para el equipo administrativo del CIBYN con menciones especiales para Karla Islas y Mayra Sandoval así como de todo el equipo de intendencia, muy en especial para la Sra. Antonia “Toñita” Sandoval y la Sra. Martha Flores, así como para el guardia Nehemías y el chofer Ernesto.

Para el equipo administrativo de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, con mención especial para Karina Navarro y para la Sra. Edmunda de intendencia.

Para mis queridos perros, muy en especial para Lucky, Toby (+) y Pelusa (+).

Para mis ex alumnos de preparatoria del Centro Escolar Gante. ¡Lo logré!

Para todos los que han trabajado como meseros y repartidores para continuar con sus estudios y/o sostener una familia ¡Ustedes tienen mis más sinceros respetos!

Para todos los que han roto, rompen y romperán los límites de lo conocido.



*Si nos negamos categóricamente a reconocer que somos susceptibles de cometer un error, una equivocación profunda – nos acompañará siempre. Pero si somos capaces de evaluarnos con un poco de coraje, por muy lamentables que sean las reflexiones que podamos engendrarnos, nuestras posibilidades mejoran enormemente.*

**Carl Sagan**

El mundo y sus demonios. La ciencia como una luz en la oscuridad (1995)

# TABLA DE CONTENIDO

<b>PORTADA .....</b>	<b>I</b>
FIRMAS DE APROBACIÓN DE TESIS .....	II
FIRMAS DE REVISIÓN DE TESIS .....	III
CONTRAPORTADA .....	IV
RESUMEN .....	IV
PRESENTACIÓN .....	VI
AGRADECIMIENTOS .....	VII
DEDICATORIA .....	VIII
TABLA DE CONTENIDO .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE TABLAS .....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XVI
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. ERA DE LOS ANTIBIÓTICOS .....	1
1.2. INFECCIONES RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS: AMENAZA MUNDIAL .....	2
1.3. PROBLEMA SANITARIO CON <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTES .....	4
1.4. TRATAMIENTOS ACTUALES PARA EL COMBATE A INFECCIONES RESISTENTES .....	5
1.5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS A LOS ANTIBIÓTICOS .....	6
<b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>8</b>
2.1. CONTROL BIOLÓGICO POBLACIONAL POR MICROORGANISMOS .....	8
2.2. BIOLOGÍA SINTÉTICA Y SU PAPEL EN PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS .....	8
2.2.1. <i>Introducción a la Biología Sintética</i> .....	8
2.2.2. <i>Definición de los biosensores</i> .....	9
2.3. <i>QUORUM SENSING</i> : COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS. ....	10
2.3.1. <i>Quorum Sensing de Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.3.2. <i>Sistema de biosíntesis de AIP: AgrB y AgrD</i> .....	12
2.3.3. <i>Sistema biosensor: AgrC y AgrA</i> .....	12
2.3.4. <i>Hipervariabilidad del AgrD y su relación con la comunicación cruzada</i> .....	12
2.4. BIOCENSORES DE CÉLULAS ENTERAS BASADOS EN DETECCIÓN DE QS .....	13
2.5. LAS BACTERIOCINAS .....	15
2.5.1. <i>Introducción a las bacteriocinas</i> .....	15
2.5.2. <i>Diferencia entre péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y antibióticos</i> .....	17

2.5.3.	<i>Bacteriocinas utilizadas contra S. aureus resistentes</i> .....	19
2.5.4.	<i>Bacteriocinas contra patógenos resistentes a los antibióticos</i> .....	19
2.5.5.	<i>Breve clasificación de las bacteriocinas</i> .....	20
2.5.6.	<i>La bacteriocina Lacticina Q</i> .....	21
2.5.7.	<i>Composición genética de la LnqQ y genes asociados</i> .....	22
2.6.	PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS .....	23
2.6.1.	<i>Péptido señal N-AmyE</i> .....	24
2.6.2.	<i>Péptido de fusión SmbP</i> .....	25
CAPÍTULO 3.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
3.1.	<i>Justificación</i> .....	26
3.2.	<i>Hipótesis</i> .....	28
3.3.	<i>Objetivo General</i> .....	28
3.4.	<i>Objetivos Específicos</i> .....	28
3.5.	<i>Metas</i> .....	29
3.6.	<i>Aportación científica</i> .....	29
CAPÍTULO 4.	METODOLOGÍA .....	30
4.1.	<i>Concepto del biosensor basado en células enteras</i> .....	30
4.2.	<i>Cepas bacterianas</i> .....	30
4.3.	<i>Diseño de módulos genéticos biosensor y de bacteriocina</i> .....	31
4.4.	<i>Estrategia general para el ensamblaje de módulos</i> .....	33
4.5.	<i>Optimización de los codones nativos en las secuencias seleccionadas</i> .....	33
4.6.	<i>Especificidad del biosensor por predicción de comunicación cruzada</i> .....	34
4.7.	<i>Predicción de solubilidad de proteínas</i> .....	34
4.8.	<i>Predicción de localización subcelular de proteínas</i> .....	34
4.9.	<i>Predicción de epítomos de células tipo B</i> .....	35
4.10.	<i>Predicción de alergenidad</i> .....	35
4.11.	<i>Diseño y análisis in silico de pETNL</i> .....	35
4.12.	<i>Diseño y análisis in silico del pSmbP-LnqQ</i> .....	37
4.13.	<i>Identificación de codones de paro en los diseños</i> .....	38
4.14.	<i>Predicción de peso molecular de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ</i> .....	38
4.15.	<i>Predicción de solubilidad y localización celular N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ</i> .....	39
4.16.	<i>Predicción de estructura secundaria y tridimensional de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ</i> .....	39
4.17.	<i>Transformación de células de E. coli con pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ</i> .....	39
4.18.	<i>Determinación de expresión proteica por SDS-PAGE</i> .....	44
4.19.	<i>Presuntas causas de la ausencia de bandas de proteínas de interés en los geles</i> .....	48

CAPÍTULO 5.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	50
5.1.	<i>Materiales y reactivos .....</i>	50
5.2.	<i>Equipos de laboratorio .....</i>	51
5.3.	<i>Lugares de experimentación .....</i>	53
5.4.	<i>Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos.....</i>	53
CAPÍTULO 6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	54
6.1.	<i>Concepto del biosensor basado en células enteras .....</i>	54
6.2.	<i>Cepas bacterianas .....</i>	55
6.3.	<i>Diseño de los módulos biosensor y de bacteriocina .....</i>	55
6.4.	<i>Estrategia general para el ensamblaje de módulos .....</i>	57
6.5.	<i>Optimización de los codones nativos.....</i>	60
6.6.	<i>Especificidad de biosensor por predicción de comunicación cruzada.....</i>	61
6.7.	<i>Predicción de solubilidad de proteínas .....</i>	64
6.8.	<i>Localización subcelular de proteínas .....</i>	64
6.9.	<i>Predicción de epítomos de células tipo B.....</i>	65
6.10.	<i>Predicción de alergenicidad.....</i>	67
6.11.	<i>Diseño y análisis in silico de pETNL.....</i>	67
6.12.	<i>Diseño y análisis in silico del pSmbP-LnqQ .....</i>	72
6.13.	<i>Identificación de codones de paro en los diseños.....</i>	73
6.14.	<i>Predicción de peso molecular de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ.....</i>	73
6.15.	<i>Predicción de solubilidad y localización celular N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ.....</i>	74
6.16.	<i>Predicción de estructura secundaria y tridimensional de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ .....</i>	75
6.17.	<i>Transformación de células de E. coli con pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ .....</i>	78
6.18.	<i>Determinación de expresión proteica por SDS-PAGE .....</i>	84
6.19.	<i>Presuntas causas de la ausencia de bandas de interés en los geles de proteínas .....</i>	95
CAPÍTULO 7.	CONCLUSIONES.....	105
<b>ANEXOS .....</b>		<b>106</b>
	<i>Divulgación de la investigación.....</i>	106
	<i>Archivos de diseño .....</i>	107
	<i>Resumen autobiográfico.....</i>	108
<b>REFERENCIAS .....</b>		<b>109</b>



# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CONCEPTO DEL BIOSENSOR BASADO EN CÉLULAS ENTERAS.....	30
FIGURA 2. SISTEMA QS PARA DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE <i>S. AUREUS</i> . ....	54
FIGURA 3. MÓDULOS BIOSENSOR Y DE BACTERIOCINA.....	55
FIGURA 4. ESTRATEGIA DE CONSTRUCCIÓN IN SILICO.....	58
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL VECTOR DUAL BIOSENSOR-KILLER.....	59
FIGURA 6. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE N-AMYE:LNQQ.....	76
FIGURA 7. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE SMBP-LNQQ.....	76
FIGURA 8. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE N-AMYE:LNQQ.....	77
FIGURA 9. PREDICCIÓN DE HÉLICES TRANSMEMBRANALES PARA N-AMYE:LNQQ.....	77
FIGURA 10. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE SMBP-LNQQ.....	78
FIGURA 11. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> DH5A Y BL21 (DE3) CON PET30A(+), PETNL Y PSMBP-LNQQ. ....	79
FIGURA 12. GEL DE AGAROSA CON PLÁSMIDOS PETNL Y PSMBP-LNQQ.....	80
FIGURA 13. SIMULACIÓN DE PCR PARA VECTORES DE EXPRESIÓN .....	83
FIGURA 14. PCR DE PETNL .....	84
FIGURA 15. PCR DE PSMBP-LNQQ.....	84
FIGURA 16. GEL DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) CON PETNL INDUCIDO A 25°C.....	87
FIGURA 17. GEL DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) PETNL INDUCIDO A 37°C .....	88
FIGURA 18. GEL DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) PSMBP-LNQQ INDUCIDO A 25°C Y 37°C .....	91
FIGURA 19. GEL DE <i>E. COLI</i> ORIGAMI PSMBP-LNQQ INDUCIDO A 25°C Y 37°C .....	92
FIGURA 20. GEL DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) CON CONTROLES INDUCIDO A 37°C.....	93
FIGURA 21. GEL DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) CON CONTROLES INDUCIDO A 25°C.....	94

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. USO DE CODONES PREVIO Y DESPUÉS DE LA OPTIMIZACIÓN. ....	61
TABLA 2. PREDICCIÓN DE COMUNICACIÓN CRUZADA.....	63
TABLA 3. PREDICCIÓN DE SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS. ....	64
TABLA 4. PREDICCIÓN DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS .....	65
TABLA 5. PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B EN LNQQ .....	66
TABLA 6. SECUENCIA AMINOACÍDICA DE N-AMYE:LNQQ .....	69
TABLA 7. SECUENCIAS UTILIZADAS PARA PREDICCIÓN DE CORTE ENZIMÁTICO DE N-AMYE:LNQQ .....	70
TABLA 8. PREDICCIÓN DE CORTE ENZIMÁTICO DE PÉPTIDO SEÑAL N-AMYE .....	71
TABLA 9. SECUENCIA AMINOACÍDICA DE SMBP-LNQQ .....	73
TABLA 10. PREDICCIÓN DE SOLUBILIDAD N-AMYE:LNQQ Y SMBP-LNQQ .....	74
TABLA 11. PREDICCIÓN DE LOCALIZACIÓN CELULAR N-AMYE:LNQQ Y SMBP-LNQQ.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
ESKAPE	Acrónimo de seis especies bacterianas <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter</i> spp.
OMS	Organización Mundial de la Salud
QS	<i>Quorum Sensing</i> (Percepción de Quórum)
LnqQ	Lacticina Q
<i>agrBDCA</i>	Operón <i>agr</i> de <i>S. aureus</i> .
<i>agrB</i>	Gen que codifica AgrB
<i>agrD</i>	Gen que codifica AgrD
HSL	Molécula homo serilactonado
AIP	Molécula autoinductora
<i>agrC</i>	Gen que codifica AgrC
<i>agrA</i>	Gen que codifica AgrA
AgrB	Transportadora proteasa necesaria para la maduración de AgrD
AgrD	Péptido precursor a la molécula autoinductora
AgrC	Receptor transmembranal con actividad histidina quinasa
AgrA	Proteína reguladora de unión al DNA de respuesta
AgrA-P	AgrA fosforilado
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
AMP	Péptidos antimicrobianos
kDA	Kilo Dalton
MIC	Concentración mínima inhibitoria
μM	Micromolar
μg/ml	Microgramo por mililitro
<i>lnqRQBCDEF</i>	Clúster genético
AmyE	Alfa-amilasa
N-AmyE	Péptido señal de la AmyE
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales
SmbP	Región citoplásmica de la SmbP (péptido de fusión)
Ala33	Las letras indican el aminoácido y los números la posición en la cadena
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
SBP	Massachusetts Institute of Technology's Registry of Standard Biological Parts
KEGG	Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes
FPB	FP Base



PDB	Protein Data Bank
nm	Nanómetros
DBK	Plásmido Dual Biosensor Killer
CAI	Cálculo de Índice de Adaptación
CUD	Codon Usage Database
BUSCA	Bologna Unified Subcellular Component Annotador
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pET30(+)	Plásmido tipo pET30(+)a sin modificaciones
pETNL	Plásmido que contiene N-AmyE:LnqQ:6xHis
pSmPc-LnqQ	Plásmido que contiene SmbP-LnqQ
LB	Medio de cultivo LB
OD600	Densidad óptica
μl	Microlitros
μg	Microgramos
°C	Grados Celsius
h	Hora
ml	Mililitro
g	Gramo
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleótidos
V	Volts
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
p/v	Peso volumen
NaCl	Cloruro de sodio
Tris-HCl	Solución de Tris ajustada con ácido clorhídrico (HCl)
M	Molar
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
APS	Persulfato de amonio
TEMED	Tetramethylethylenediamine
X	Veces de concentración de trabajo
mm	Milímetros
lnqQ	Gen de lacticina Q
P2	Promotor 2 inducible del operón <i>agr</i> de <i>S. aureus</i>
gfp	Gen de GFP
GFP	Proteína verde fluorescente
J23110	Promotor J23110 constitutivo para <i>E. coli</i>
AIP-I	AIP clase I
AIP-II	AIP clase 2
AIP-III	AIP clase 3
AIP-IV	AIP clase 4

Ala	Alanina (A)
Arg	Arginina (R)
Asn	Asparagina (N)
Asp	Asparato (D)
Cys	Cisteína (C)
Gln	Glutamina (Q)
Glu	Glutamato (E)
Gly	Glicina (G)
His	Histidina (H)
Ile	Isoleucina (I)
Leu	Leucina (L)
Lys	Lisina (K)
Met	Metionina (M)
Phe	Fenilalanina (F)
Pro	Prolina (P)
Ser	Serina (S)
Thr	Treonina (T)
Trp	Triptófano (W)
Tyr	Tirosina (Y)
Val	Valina (V)
Pnl	Liasa de pectina
AmyE	Amilasa E
N-AmyE:Pnl	Liasa de pectina asociada con el péptido señal N-AmyE
N-AmyE:AmyE	Amilasa E asociada con el péptido señal N-AmyE
VpDef	Defensina de <i>Venerupis philippinarum</i>
Bin1b	Defensina de <i>Rattus norvegicus</i>
LL-37	Catelicidina de humanos/chimpancés
SmbP-VpDef	VpDef asociado con SmbP
SmbP-Bin1b	Bin1b asociado con SmbP
SmbP-LL-37	LL-37 asociado con SmbP
SUMO-LnqQ	LnqQ asociado con SUMO
AI	Índice alifático
GRAVY	Índice de hidrofobicidad

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de nuestra historia, los humanos hemos desarrollado soluciones a los problemas del mundo que nos rodea. No es extraño que el combate a las enfermedades sean uno de los temas más recurrentes. Existen referencias históricas entre las diferentes civilizaciones de la antigüedad como los chinos (Nicola & Abagyan, 2009), aztecas (Davidson & De Montellano, 1983) y los nubia-sudaneses (Bassett, Keith, Armelagos, Martin, & Villanueva, 1980) del uso empírico de sustancias para tratar infecciones y enfermedades. Hace unos doscientos años atrás, se pensó que los subproductos de la revolución industrial serían tratamiento efectivo contra infecciones y aunque los resultados fueron alentadores al principio, los resultados observados ante otro tipo de infecciones no tuvieron el mismo éxito (Gaynes, 2017).

### 1.1. Era de los antibióticos

En 1928, Alexander Fleming encontró una solución efectiva para contrarrestar las infecciones al describir al hongo *Penicillium notatum* que tenía efectos antagónicos sobre diferentes cepas estafilocócicas (Fleming, 1929), inaugurando así la conocida era dorada en descubrimiento de los antibióticos (Podolsky, 2018). Las virtudes observadas en los antibióticos fueron rápidamente puestas en juicio cuando el mismo Fleming vaticinó en su discurso de entrega al premio Nobel que el abuso y uso excesivo de los antibióticos podría generar brotes de patógenos resistentes a los antibióticos (Fleming, 1945): Cada vez que un nuevo antibiótico era liberado a los sistemas de salud públicos, pronto se reportaba un brote de resistencia relacionado a antibiótico (Clatworthy, Pierson, & Hung, 2007). Con el boom de nuevas clases de antibióticos desde los 1940s hasta principios de 1970s, la alerta por resistencia a los antibióticos quedó prácticamente inadvertida. De hecho, entre los 1960s y 1970s, existe evidencia que la comunidad científica internacional fue apática y minimizó el hecho de que el abuso de los antibióticos fuera una causa de resistencia a los fármacos en las bacterias patógenas (Podolsky, 2018).

El tema de la resistencia a los antibióticos no tuvo impacto suficiente hasta que con el paso de las décadas, surgieron de brotes de patógenos resistentes de importancia clínica como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) tanto en Reino Unido (Gardner, Oxon, Stamp, Bowgen, & Moore, 1962) como en Estados Unidos (Barrett, McGehee, & Finland, 1968), y además las nuevas clases de antibióticos empezaron a escasear desde los 1980s hasta casi los 2000s. Adicionalmente, los inversionistas se motivaron a encontrar nuevas clases antibióticos al observar más ganancias en descubrir compuestos anticancerígenos (Ventola, 2015), los reglamentos sanitarios se volvieron más estrictos para la liberación de antibióticos para prevenir la presentación de infecciones multirresistentes emergentes (Davies, 2006). Todos estos factores, incluyendo otros que tal vez no fueron mencionados, allanaron el establecimiento de políticas en salud pública para buscar o sintetizar algún fármaco o sustancia que contrarreste el avance de microorganismos patógenos resistentes de relevancia clínica (World Health Organization, 2017).

## **1.2. Infecciones resistentes a los antibióticos: amenaza mundial**

Cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostraron el peligroso ascenso de infecciones por bacterias resistentes en las últimas décadas donde se calcula un promedio de 700,000 muertes anuales para el 2019 (World Health Organization, 2019b) y la advertencia de que si los gobiernos y organizaciones responsables de la salud pública a nivel mundial no elaboran políticas efectivas para el 2050, tendremos un promedio de 10 millones de muertes al año por consecuencias de este tipo de infecciones (Dadgostar, 2019).

En México carecemos de un sistema de recolección de datos confiables en este tipo de infecciones (Amabile-Cuevas, 2010), pero en un estudio realizado durante seis meses del 2019 se recuperaron 23,000 cepas resistentes a fármacos en 47 centros de salud públicos de todo el país, siendo algunas de las más comunes *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Vazquez-Rodriguez et al., 2018).

En todas las regiones del mundo, las infecciones resistentes han tenido un peligroso ascenso. En Estados Unidos, las muertes anuales por infecciones resistentes pasaron de 23,000 muertes en 2013 (Frieden, 2013) a 35,000 durante el 2019 (CDC, 2019). Por otro lado, en Europa, las muertes atribuibles a infecciones resistentes aumentaron de 25,000 en 2007 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009) a 33,110 en 2015 (Cassini et al., 2019). En 42 países del continente africano, se registraron 54,000 casos atribuibles a tuberculosis multirresistente (MDR, *multi-resistant*) y en ocho países se registraron 3,200 muertes relacionadas a la variante extremadamente resistente (XDR, *extreme resistant*) en un período del 2004 al 2011 (Ndhokubwayo et al., 2013). En el continente asiático, en China por ejemplo, el rango de bacterias aislados que eran resistentes a los antibióticos pasó de 22,774 casos a 190,610 de 2005 a 2017, respectivamente (Qu, Huang, & Lv, 2019); en la India, un estudio reporta que el 70% de aislados clínicos tipo Gram negativos son resistentes a los fármacos y entre ellos se podían encontrar cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Taneja & Sharma, 2019).

Las infecciones resistentes son material incluso de interés para el sector económico. El Banco Mundial ha elaborado dos escenarios para predecir el impacto económico de las infecciones resistentes para el 2050: en un escenario de bajo impacto, el Producto Interno Bruto (PIB) mundial podría disminuir hasta un 1.1%. Sin embargo, en un escenario de alto impacto, el daño al PIB global podría representar hasta una disminución de 3.8%. Los costos al sistema de salud público en el mundo podrían oscilar entre los \$300 mil millones a \$1 cuatrillón, presentando incluso un serio riesgo para el sector ganadero ya que en el escenario de bajo impacto, esto representaría una disminución de 2.6% esperado a un 7.5% en un escenario de alto impacto (The World Bank, 2016).

Las infecciones resistentes representa un punto de interés incluso para la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*), ya que actualmente se presume que en 42

países donde existen datos confiables de consumo de antibióticos en el sector ganadero y de agricultura, se estima que en el 2010, el consumo era de 63,000 toneladas de antibiótico/año mientras que para el 2030 se estima un consumo 105,600 toneladas de antibiótico/año, representando un incremento de 67%. Los índices de metabolización de antibióticos tanto en ganado como en producción pesquera presentan una baja metabolización, ya que entre un 70-80% y un 75-90%, respectivamente, son excretados a las fuentes acuíferas. La producción de cultivos consume entre un 0.2% a 0.4% del total de antibióticos en relación con la producción ganadera (FAO, s/f).

La relevancia sanitaria mundial de *S. aureus* es porque se trata de un miembro del grupo ESKAPE, un grupo de patógenos localizados en infraestructuras hospitalarias, asilos o en equipos e instrumentos médicos como ventiladores y catéteres y que son habitualmente resistentes a los antibióticos (Rice, 2008). Esta bacteria es la primera causa nosocomial tanto en Latinoamérica (26%), Norteamérica (26.0%) y la segunda causa nosocomial de Europa (19.5%) (Biedenbach, Moet, & Jones, 2004). Se presume que un 30% de la población total de humanos está colonizado con al menos una subespecie de *S. aureus* (Wertheim et al., 2005) y esto podría ser porque el hábitat de esta bacteria en los humanos es la parte anterior de las fosas nasales (Mulcahy & McLoughlin, 2016).

### **1.3. Problema sanitario con *Staphylococcus aureus* resistentes**

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva y es considerada una de las principales causas de enfermedades en piel (Foster, 1996). Además, es capaz de desarrollar biopelículas en dispositivos implantados en seres humanos y catéteres causando infecciones crónicas y persistentes (Dunne, 2002). La osteomielitis y periodontitis también son producto de la biopelícula; este patógeno está involucrado en heridas crónicas en pacientes diabéticos con úlceras y está relacionado a infecciones al endocardio, oculares y en casos de rinosinusitis crónica (Archer et al., 2011). Se considera que es un patógeno de alto riesgo para pacientes con Fibrosis Quística ya que es el más reportado entre personas con 11 a 15 años con esta condición (Razvi et al., 2009).

Ahora bien, se estima que entre un 13% al 74% del total de infecciones resistentes en el mundo son causados por una variante resistente de *S. aureus* resistente a la meticilina, la cepa MRSA (Köck et al., 2010), la cual está es señalada desde el 2017 por la OMS como un patógeno de alta prioridad al que debe encontrarse una solución pronta y efectiva (World Health Organization, 2017). Por ejemplo, en Estados Unidos, el total de pacientes por infecciones nosocomiales tipo MRSA ascendió de 2.4% en 1975 a un 29% en 1991 (Panlilio et al., 1992) y hasta casi 57% para el año 2000 (NNIS, 2004). En la actualidad, el MRSA es considerado endémico en ese país, ya que se estima que el 2% de la población es acarreador de este estafilococo (Kavanagh, 2019).

En México, los primeros casos de MRSA asociado a comunidad (CA-MRSA) cepa USA300 fueron reportados a inicios del 2008 (María E. Velazquez-Meza et al., 2011) y durante el 2010, un estudio anunció que la cepa de MRSA más frecuentemente aislada en nuestro país era la New York/Japan (Rodríguez-Noriega et al., 2010). También se conoce que cepas de MRSA en hospitales públicos en nuestro país, fluctuó entre un 7% al 30% en pacientes entre las décadas de 1980s a 2000s (M E Velazquez-Meza et al., 2004) mientras que el Instituto Nacional de Cancerología determinó que 1.7% de las cepas aisladas de 3,000 hemocultivos recuperados entre el 2005 al 2015 de pacientes con cáncer correspondían a MRSA (Velázquez-Acosta, Cornejo-Juárez, & Volkow-Fernández, 2018).

#### **1.4. Tratamientos actuales para el combate a infecciones resistentes**

En la actualidad, las clases más comunes de antibióticos para combatir infecciones resistentes a los antibióticos son las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, glucopéptidos y monobactámicos (Taylor, Stapleton, & Paul Luzio, 2002). En las últimas dos décadas, se han aprobado una gran variedad de antibióticos para el tratamiento de infecciones causados por bacterias tanto Gram positivos como Gram negativos. Los antibióticos más recientemente reportados para el tratamiento de bacterias multirresistentes Gram

positivas incluyen  $\beta$ -lactámicos (ceftarolina y ceftobiprol), glicopéptidos (dalbavancin, oritavancin y telavancin), oxazolidinonas (tedizolid fosfato), quinolonas (besifloxacin, delafloxacin y ozenoxacina) y tetraciclinas (omadaciclina) (Koulenti et al., 2019). Según la OMS, hasta el 2019, se sabe de 50 agentes antimicrobianos que se encuentran en desarrollo clínico donde 32 son antibióticos activos contra patógenos de prioridad de la OMS, diez son agentes biológicos, 2 son clasificados como agentes novedosos y dos pertenecen al grupo de bacterias Gram negativas multirresistentes (World Health Organization, 2019a).

### **1.5. Tratamientos alternativos a los antibióticos**

Los patógenos resisten a los antibióticos bajo tres grandes mecanismos de resistencia: intrínseca, adaptativa, y/o adquirida (Arzanlou, Chai, & Venter, 2017; Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015; Sandoval-Motta & Aldana, 2016). Es por ello que urge desarrollar una solución pronta y efectiva para contrarrestar las infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos, los cuales son uno de los puntos que la OMS ha declarado como prioritarios (O'Neill, 2016).

En la guerra contra la resistencia a los antibióticos, nuestro grupo de investigación ha participado en la creación de compuestos que puedan combatirlos como tratamientos mixtos de antibióticos (Montelongo-Peralta, León-Buitimea, Palma-Nicolás, Gonzalez-Christen, & Morones-Ramírez, 2019), nanopartículas de plata asociados con metales de transición (Javier A. Garza-Cervantes et al., 2017), nanomateriales asociados con nanopartículas de plata sintetizados con polímeros sensibles al ambiente (Ruben Morones & Frey, 2007) o producidos de manera sustentable (Escárcega-González et al., 2018) o a partir de un exopolisacárido producido por una levadura que actúa como agente reductor y que están capeados por agentes con actividad antimicrobiana y antibiopelícula (Javier Alberto Garza-Cervantes et al., 2019).

Otros grupos de investigación también han desarrollado otro tipo de armas contra la resistencia a los antibióticos como el uso de técnicas de decorado en bacteriófagos (*phage display*) para producir vacunas en la cápside de bacteriófagos inhabilitados (Bao et al., 2019) o uso de agentes de control biológico



contra patógenos de alimentos (Gutiérrez, Fernández, Rodríguez, & García, 2019) o para el tratamiento de aguas residuales (Jassim, Limoges, & El-Cheikh, 2016).

Los esfuerzos actuales se han focalizado en encontrar y/o desarrollar nuevas clases de antibióticos y agentes antimicrobianos contra bacterias resistentes (Fair & Tor, 2014) y de prioridad ante la OMS (World Health Organization, 2017). Las corrientes alternativas a los antibióticos más reconocidas en la actualidad están clasificadas en dos grandes enfoques: el enfoque de prevención a las enfermedades donde se desarrollan y se utilizan vacunas, probióticos o prebióticos mientras que en el enfoque por tratamiento a las enfermedades se utilizan la terapia de fagos, la aplicación directa de endolisinas y/o exolisinas, el uso de microorganismos depredadores vivos o el uso directo de bacteriocinas (Allen, Trachsel, Looft, & Casey, 2014). También la Biología Sintética se ha involucrado en resolver la problemática de infecciones resistentes a los fármacos al participar en el diseño de biosensores basados en células completas que sean capaces de destruir patógenos mediante la previa de detección de moléculas excretadas por microorganismos de interés (Benítez-Chao, Balderas-Cisneros, León-Buitimea, & Morones-Ramírez, 2021).

La biosíntesis, purificación y aplicación de bacteriocinas contra patógenos Gram negativos y Gram positivos ha sido punto central para diversos grupos de investigación (Cabral, Penumutchu, Norris, Morones-Ramirez, & Belenky, 2018; McAuliffe et al., 1998; Rea, Ross, Cotter, & Hill, 2011; Sandiford & Upton, 2012; Wong et al., 2015) así como la síntesis de nanocompuestos como liposomas, quitosano y nanopartículas hechos a base de compuestos de plantas (Sidhu & Nehra, 2017) o de nanofibras (Fahim, Khairalla, & El-Gendy, 2016) que estén acompañados con bacteriocinas. Más adelante se describirán detalles sobre las bacteriocinas y su relación en el combate a las infecciones resistentes a los antibióticos.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Control biológico poblacional por microorganismos**

En la Naturaleza, todos los seres vivos están interactuando y compitiendo por nichos ecológicos para sobrevivir, crecer y reproducirse para una adaptación efectiva en el ambiente donde se desarrollan. Este fenómeno es universal ya que pueden encontrarse en estilos de vida unicelulares y multicelulares (Grice et al., 2009). Para competir por los nutrientes, los microorganismos contienen compuestos que matan o limitan el crecimiento de otra población. Estos compuestos pueden ser antibióticos, péptidos antimicrobianos, moléculas de bajo peso molecular, entre otros más (Gonzalez et al., 2011, 2010).

Cuando microorganismos vivos por sus características biológicas son usados para suprimir la densidad poblacional de un tipo específico de organismo, haciéndolo menos abundante o dañino, se le conoce como control biológico. Es importante mencionar que esta definición solo incluye a especímenes vivos como depredadores, parásitos, nemátodos, hongos, bacterias, protozoarios, inclusive virus. Sin embargo, genes sin un recipiente biológico o metabolitos producidos por un organismo de control sin que éste se encuentre presente durante el control poblacional son excluidos de esta definición (Eilenberg, Hajek, & Lomer, 2001).

Por ejemplo, cultivos de *Candida albicans* (Peters et al., 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (Filkins et al., 2015), *Bacillus subtilis* (Gonzalez et al., 2011), *Enterococcus faecium* (Viçosa et al., 2018), *Acanthamoeba polyphaga* (de Souza, Soares, Benitez, & Rott, 2017) disminuyeron la expresión de patogenicidad en *S. aureus*. Incluso, cultivos de *E. coli* han mostrado actividad fungicida contra cultivos de *C. albicans* (Cabral et al., 2018).

### **2.2. Biología Sintética y su papel en producción de bacteriocinas**

#### **2.2.1. Introducción a la Biología Sintética**

La Biología Sintética consiste en diseñar librerías de elementos genéticos como promotores, secuencias codificadoras, terminadores, factores de transcripción, entre otras más; así también se enfoca en el ensamblaje de circuitos genéticos

hasta en el diseño y creación de organismos completos. Este campo utiliza datos cuantitativos para crear modelos biológicos y matemáticos que permitan predecir el comportamiento de un sistema biológico (Cameron, Bashor, & Collins, 2014; García-Granados, Lerma-Escalera, & Morones-Ramírez, 2019).

En la publicación de Brophy y Voigt se revisan los principios básicos para el diseño de circuitos genéticos para que los sistemas biológicos sean emulados para cumplir con tareas o puedan fabricar materiales; es importante considerar la correcta elección de reguladores así como puntos de control que cuantifiquen el impacto en el rendimiento (Brophy & Voigt, 2014).

### **2.2.2. Definición de los biosensores**

Un sensor químico es un dispositivo que transforma en una información química en una señal analítica de utilidad y puede detectar desde la concentración de una muestra específica hasta el análisis total de sus compuestos. Este tipo de sensores contiene dos unidades funcionales básicas: un receptor y un transductor. El receptor transforma la información química de la muestra en una forma de energía que puede ser medido por un transductor. El transductor transforma la energía en una señal analítica útil (Hulanicki, Glab, & Ingman, 1991). De esta manera, comprendemos que un biosensor es “un dispositivo que, a través de reacciones específicas de enzimas aisladas, sistemas inmunes, tejidos, organelos o células enteras, sirve para detectar compuestos” (IUPAC, 1992).

Así, en los biosensores basados en células completas, un analito de interés ingresa al interior celular y es reconocido por un factor transcripcional, el cual controla la transcripción de un gen mediante el reconocimiento de un promotor específico. Estos biosensores pueden reconocer diferentes analitos como hidrocarburos, metales pesados, antibióticos (Garnier-Rocha, 2019). Incluso, algunos modelos biosensores se han aprovechado del fenómeno de *quorum sensing* para crear sistemas de comunicación sintéticos con la capacidad de controlar poblaciones (Balagaddé et al., 2008).

### **2.3. *Quorum Sensing*: Comunicación entre células.**

El concepto QS refiere a que es un mecanismo de comunicación entre microorganismos que dependen de señales químicas (moléculas señalizadoras) que son excretadas al medio extracelular y que dependen la densidad celular (Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994). Las bacterias, similares a organismos de diferentes dominios, se sostienen de mecanismos de comunicación y se valen de diferentes moléculas. Esta interacción puede ser intrínseca (es decir, intracelular o adentro de la misma célula) o extrínseca (es decir, extracelular o afuera de la célula) y crea un fenotipo de respuesta en una población específica del mismo (Fuqua et al., 1994).

Mientras los cultivos productores de QS estén creciendo, éstos pueden producir, excretar, acumular y detectar moléculas de señalización químicas externas conocidas como autoinductores, los cuales son producidos a niveles basales pero que se acumulan en el exterior celular. Cuando la densidad celular de bacterias y la concentración de moléculas autoinductoras alcanzan un umbral de concentración específico, el cultivo experimenta un cambio en su fenotipo (Garg, Manchanda, & Kumar, 2014; Rutherford & Bassler, 2012). Esta respuesta varía según el tipo de señal emitido ya que su forma y composición química es diferente según la especie que la produzca (Fuqua et al., 1994) siendo las respuestas más comunes: la formulación de esporulados, factores de virulencia asociados a invasión, bioluminiscencia, virulencia y/o la creación biopelículas (Miller & Bassler, 2002).

El fenómeno de QS sucede tanto en bacterias productoras Gram negativas y las Gram positivas pero las moléculas auto inductoras son de diferente composición química. En las bacterias Gram negativas, las moléculas de señalización son conocidas como homoserina lactonada aciladas (HSL) mientras que en bacterias Gram positivas, el mecanismo es a través de péptidos excretados (Miller & Bassler, 2002).

En el modelo general de QS en Gram positivos: en primera instancia, el gen que contiene el precursor de la molécula señalizadora (también conocido como

autoinductor inmaduro) es transcrito y traducido, y ésta es posteriormente parcialmente hidrolizada para crear un autoinductor maduro. Éste último es enviado al exterior celular por un transportador tipo ABC. Cuando la concentración del autoinductor maduro alcanza un umbral mínimo de activación, una proteína tipo quinasa sensor de histidina localizada en el exterior celular detecta la presencia de ésta mediante un sistema a dos componentes. El sensor quinasa se auto fosforila en un residuo conservado de histidina (H). Después, este grupo fosforilo es transferido a una proteína reguladora de respuesta adyacente, la cual es fosforilada en un residuo conservado de aspartato (D). La proteína reguladora de respuesta fosforilado activa la transcripción de los genes de interés (Miller & Bassler, 2002).

### **2.3.1. Quorum Sensing de *Staphylococcus aureus***

En *S. aureus* está gobernado por el operón *agr* que es de un tamaño nucleotídico de 3.5 kb y se compone de dos unidades transcriptómicas divergentes conocidos como RNAII y RNAPIII, los cuales están gobernados por los promotores P2 y P3, respectivamente (Le & Otto, 2015). El promotor P2 está involucrado en actividades del QS mientras que el promotor P3 se encarga de la expresión de factores de virulencia (Miller & Bassler, 2002) como producción de hemolisinas, proteasas, lipasas e indirectamente, participan en la liberación de biopelículas (Quave & Horswill, 2014). A nivel genético, la inducción del operón *agr* depende parcialmente por la unión de los productos génicos del operón *sar* en los dos promotores disponibles del operón *agr* (Manna, Bayer, & Cheung, 1998).

El promotor P2 es el de importancia para el sistema QS debido a que el transcrito resultante *agrBDCA* produce cuatro proteínas: AgrB, AgrD, AgrC y AgrA, los cuales son los componentes principales del sistema de QS de *S. aureus*. A manera de resumen podemos en global que AgrC y AgrA participan como elementos biosensores mientras que AgrB y AgrD son los elementos necesarios para la biosíntesis de AIP. El AgrD es un péptido precursor a la molécula autoinductora (AIP, por sus siglas en inglés) y el AgrB funciona transportadora

como proteasa y está involucrada en la maduración del AIP (Gomes-Fernandes et al., 2017; Horswill, Stoodley, Stewart, & Parsek, 2007).

### **2.3.2. Sistema de biosíntesis de AIP: AgrB y AgrD**

El gen que produce AgrD se expresa y se traduce en una versión propéptido de la molécula AIP que sufre de una modificación postraduccionalmente para que sea biológicamente activo. La molécula AIP inmadura se compone de tres secciones conocidas como región del péptido líder, región madura del AIP y secuencia de reconocimiento, que corresponden a las regiones N-, central y C-terminales, respectivamente (B. Wang & Muir, 2016).

El AgrD es inicialmente procesado en la región N-terminal (se compone de 32 residuos) y sirve de guía. Éste es translocado a la cara externa de la membrana celular. Mientras la región peptidasa de la proteína transmembranal AgrB reconoce la región N-terminal del AIP inmaduro.

### **2.3.3. Sistema biosensor: AgrC y AgrA**

AgrC y AgrA funcionan en conjunto con un sistema clásico de dos componentes. Donde, la proteína transmembranal tipo receptor con actividad histidina quinasa AgrC, se encarga de que detectar las moléculas AIP liberadas al exterior por *S. aureus*; una vez acoplado el AIP con el receptor, éste último causa una autofosforilación del dominio citoplasmático del AgrC seguido de la transferencia del grupo fosfato de la proteína reguladora de respuesta de unión al DNA, AgrA. Una vez que AgrA es fosforilado (AgrA-P) éste se une a la región intergénica de los promotores P2 y P3 del operón *agr* (Gomes-Fernandes et al., 2017).

### **2.3.4. Hipervariabilidad del AgrD y su relación con la comunicación cruzada**

Bioquímicamente, el AgrD inmaduro tiene un tamaño entre 46 a 47 residuos según su clase. Después de procesamiento, AgrD maduro tiene un tamaño final entre 7 a 8 aminoácidos (que varía según la clase) y contiene un anillo tiolactonado, producto de la condensación entre un grupo tiol de una cisteína interna ubicada cuatro aminoácidos antes del último aminoácido y el grupo carboxilo del último

aminoácido (que puede ser metionina o fenilalanina, dependiendo la clase) (B. Wang, Zhao, Novick, & Muir, 2015).

En AgrC, el dominio que contiene los elementos para detección del receptor de la molécula AIP, produce diferentes formas de propéptidos. De esta manera se deduce que cada molécula de AIP producida depende de su propia proteína detectora AgrC. Por tanto, la presencia en el medio de moléculas de AIP que no están filogenéticamente relacionadas resultan en la inhibición de QS. Es decir, miembros productores del mismo tipo de AIP pueden inducir el comportamiento típico por QS pero si los productores no pertenecen al mismo grupo, se puede inhibir su respuesta. Este fenómeno es conocido como comunicación cruzada (Rutherford & Bassler, 2012). La región hipervariable del operón *agr* está ubicado en el transcrito gobernado por el promotor P2, entre los genes *agrC*, *agrD* y *agrB*. Consensualmente, se ha determinado cuatro grandes clases de AIP y permite clasificar a los tipos de *S. aureus* en base a esta región (Shopsin et al., 2003).

## **2.4. Biosensores de células enteras basados en detección de QS**

A continuación, presentamos una compilación de publicaciones de diferentes células que fueron modificadas para actuar como biosensores capaces de detectar moléculas producidas por organismos productores de señales químicas tipo QS, algunos de los ejemplos mencionados cuentan con la capacidad de producir y/o liberar sustancias antimicrobianas capaces de destruir al productor de esas señales.

Balagaddé y otros diseñaron un sistema de comunicación sintético conocido como depredador y presa en la que dos células modificadas de *E. coli* son capaces de comunicarse -y matar a una de ellas- a través del sistema de QS. En este modelo, las células asignadas como depredadoras producen y liberar moléculas tipo QS que se difunden en el medio y al llegar a la célula presa, por sus mecanismos internos, activan la producción una toxina específica para la célula asignada como presa, provocándoles la muerte celular. Por otro lado, las células presas, para evitar su muerte temprana, deben producir constantemente una proteína antitoxina que anule la actividad de la toxina (Balagaddé et al., 2008).

Saeidi y sus colaboradores crearon un biosensor de células enteras basados en la detección del QS al modificar células de *E. coli* para que detectaran moléculas 3OC<sub>12</sub> HSL producidas por *P. aeruginosa*. En este sistema, las moléculas QS son difundidas a través del medio y son reconocidas por un factor de transcripción en *E. coli* que activa una unidad transcripcional para producir piocianina, un antibiótico específico con actividad contra *P. aeruginosa*, y porina E7, un agente lítico específico contra *E. coli*; a medida que aumenta la concentración de la molécula QS, incrementa la concentración del antibiótico y de la porina. Cuando se acumula suficiente cantidad de porinas en el interior celular, las células de *E. coli* son lisadas y se libera piocianina para finalmente atacar a las células de *P. aeruginosa* (Saeidi et al., 2011). Dos años más tarde, Gupta y sus colaboradores, modificaron este biosensor agregando un módulo de excreción que libera una sustancia antimicrobiana al exterior a través de un péptido señal y atacar específicamente a *P. aeruginosa*, evitando la muerte de la célula productora de antibiótico (S. Gupta, Bram, & Weiss, 2013).

Marchand y sus colegas crearon un sistema de comunicación interespecífico para la interacción entre dos bacterias con orígenes evolutivos diferentes: *Bacillus megaterium* (Gram positiva) y *E. coli* (Gram negativa) utilizando el mecanismo del operón *agr* de *S. aureus*. En este reporte, células de *E. coli* fungieron como productoras de moléculas de QS al expresar las proteínas AgrD y AgrB, que en condiciones nativas, producen moléculas de AIP en *S. aureus*. Mientras que células de *B. megaterium* fungieron como biosensores al producir las proteínas AgrC y AgrA, que en condiciones nativas, sirven como un sistema a dos componentes que detectan la presencia externa de la molécula de AIP y activan a un factor de transcripción (Marchand & Collins, 2013).

Zeng y sus colaboradores crearon un modelo biomatemático a partir de una *E. coli* que funcionara como un biosensor de moléculas de AIP producidas por *S. aureus*, que sería contrarrestado por acción de la lisostafina, una bacteriocina de actividad contra *S. aureus*. La simulación del modelo indicó que una célula de *E. coli* podría tardar hasta 2.5 horas en detectar las primeras moléculas de AIP producidas de *S.*



*aureus* al tiempo que generaría la suficiente concentración de bacteriocinas para matar a células de *S. aureus* (Zeng et al., 2013)

Borrero y sus colegas, crearon un biosensor de células enteras basado en la detección de moléculas de QS para poder contrarrestar moléculas de QS producidos por un patógeno de interés clínico resistente a los antibióticos. En este caso, células modificadas de *Lactobacillus lactis* fueron capaces de detectar las moléculas producidas por *Enterococcus faecalis*. El lactobacilo modificado mostró alta efectividad de tres bacteriocinas producidas para controlar el crecimiento de este patógeno incluyendo sus variedades multirresistentes (Borrero, Chen, Dunny, & Kaznessis, 2015).

Holowko y sus colegas desarrollaron células de *E. coli* capaces de sentir moléculas de QS producidas por *Vibrio cholerae* (Holowko, Wang, Jayaraman, & Poh, 2016). Mientras que, Lubkowitz y sus colaboradores, modificaron células de *Lactobacillus reuteri* con la capacidad para detectar moléculas de AIP clase I producidas por *S. aureus* en rangos de concentración desde la escala nanomolar hasta micromolar (Lubkowitz et al., 2018).

## **2.5. Las Bacteriocinas**

En contexto a la anterior sección, una fracción del total de biosensores de células enteras diseñados son capaces de producir y excretar sustancias antimicrobianas que afecten el crecimiento de células productoras de moléculas QS. Para fines de este trabajo, nos referimos a las bacteriocinas como sustancias antimicrobianas que pertenece a un grupo de péptidos con actividad antimicrobiana con origen evolutivo en bacterias, los cuales serán descritos a continuación.

### **2.5.1. Introducción a las bacteriocinas**

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos de bajo peso molecular que son producidos exclusivamente y excretados por bacterias y que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otra bacteria. Las bacteriocinas pueden ser producidas *in situ* por bacterias probióticas. Al ser de origen proteico, las bacteriocinas son sujetos a modificaciones por Ingeniería Genética (Cotter, Ross, & Hill, 2013). Las

bacteriocinas usualmente actúan por permeabilización por membrana causada por su naturaleza catiónica al interactuar con la membrana. Usualmente las bacteriocinas son de carácter hidrofóbico y anfipático. Su estructura química son generalmente péptidos acoplados con glicoproteínas y lipoproteínas. Su punto isoelectrico está habituado a 8.1 a 10.1, usualmente son termoestables y tiene un rango de pH amplio entre 3.0 a 9.0 (Heredia-Castro, Hernández-Mendoza, González-Córdova, & Vallejo-Cordoba, 2017). En la Naturaleza, cuando las bacterias comparten el mismo nicho ecológicos, éstas deben luchar y defenderse de otros y las bacteriocinas son uno de los mecanismos biológicos reconocidos (Duffy, Schouten, & Raaijmakers, 2003).

La disponibilidad de datos en bacteriocinas en la Naturaleza es muy amplio ya que se presume que un 99% del total de bacterias son productoras de al menos un tipo de bacteriocina y muchos de ellos permanecen aún sin ser descubiertos (Klaenhammer, 1988). Hasta la fecha, de acuerdo con datos de bases de datos sobre bacteriocinas de calidad mundial (actualizado hasta la última versión, 25 de junio de 2021) indican que el *University of Nebraska Medical Center's Antimicrobial Peptide Database* (ADP, por sus siglas en inglés) (<https://wangapd3.com/main.php>) se mantienen registrados un total de 3,257 péptidos antimicrobianos de los seis reinos biológicos existentes, de los cuales 181 son péptidos con actividad anti-MRSA (G. Wang, Li, & Wang, 2016). Aunque *Bactibase* (<http://bactibase.hammamilab.org/main.php>) es una base de datos de bacteriocinas que no se ha actualizado desde 2017, sus datos siguen siendo muy valiosos ya que nos ofrece una realidad en la ciencia de las bacteriocinas puesto que la mayoría de las bacteriocinas descubiertas han sido aisladas de bacterias Gram positivas donde 206 pertenecen a este grupo y 19 a las cepas Gram negativas. El género más reportado para las bacteriocinas de origen en Gram positivas son los *Lactobacillus*, seguido de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y el género *Bacillus* mientras que el género más reportado para las bacteriocinas de origen en Gram negativas es *Escherichia*. El tamaño promedio de las bacteriocinas es de 43 residuos (Hammami, Zouhir, Le Lay, Ben Hamida, & Fliss, 2010).

Un buen número de bacteriocinas han sido previamente reportadas como agentes terapéuticos puesto que se han utilizado en dosis hasta cien veces superiores al valor de concentración mínima inhibitoria reportado sin presentar efectos citotóxicos en líneas celulares eucarióticas (Hols, Ledesma-García, Gabant, & Mignolet, 2019) ni en tejidos del hospedero (Kurlenda & Grinholc, 2012). Por ejemplo, la nisina, la bacteriocina más famosa en la industria y en el mundo ha sido declarado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS, por sus siglas en inglés) para su uso como conservador de alimentos (Cotter, Hill, & Ross, 2005). Se sabe que la mayoría de las bacteriocinas han tenido un largo historial de seguridad (Silva, Silva, & Ribeiro, 2018). Sin embargo, a pesar de la gran disponibilidad de datos de ensayos en bacteriocinas, recientemente se ha manifestado la urgencia de incrementar y explorar su uso en modelos *in vivo* para evaluar su eficacia como agentes antimicrobianos y evaluar los posibles efectos secundarios, los cuales son necesarios para asegurar su éxito como candidatos potenciales a agentes terapéuticos en su lucha contra infecciones resistentes a los antibióticos (Benítez-Chao, León-Buitimea, Lerma-Escalera, & Morones-Ramírez, 2021).

### **2.5.2. Diferencia entre péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y antibióticos**

Los péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y antibióticos son sustancias de origen biológico que cumplen con el mismo papel de defensa, lo cierto es que existen claras diferencias entre ellas que dependen de su origen, composición química, entre más factores. A continuación, se ofrece una breve explicación entre los diferentes tipos de sustancias antimicrobianas.

Los Péptidos Antimicrobianos (AMP, *antimicrobial peptides*) también conocidos como péptidos de autodefensa (HDP, *host defense peptide*) son péptidos producidos por un hospedero y son parte del sistema inmune al conferirles capacidades defensivas. Son de un rango de tamaño entre 10 a 60 residuos, en promedio 33.26 residuos que están compuestas mayoritariamente por  $\alpha$ -hélices con cargas positivas (catiónicas) o anfipáticas (cargas hidrofóbicas e hidrofílicas);

también existen referentes con carga aniónica. Los AMP están clasificados según su origen ya que están ubicuamente presentes en todos los reinos biológicos como mamíferos, plantas, microorganismos, acuáticos, insectos y/o anfibios; según su actividad ya que pueden ser antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, antivirales, antiparasitarios y/o anticancerígenos; según su estructura como tipo lineal, con estructurales secundarias con  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -tiras plegadas y por según por el tipo dominante de aminoácidos como glicina, arginina, prolina, histidina y triptófano (Huan, Kong, Mou, & Yi, 2020; Lei et al., 2019).

Si el AMP es de origen evolutivo bacteriano se les conoce como bacteriocinas. Los orígenes pueden ser por bacterias Gram positivas como negativas, incluyendo miembros del dominio de las *Archaea* (Chikindas, Weeks, Drider, Chistyakov, & Dicks, 2018). Sin embargo, cuando el AMP es de origen eucariótico, existen tres clasificaciones: defensinas (Shafee, Lay, Hulett, & Anderson, 2016), histatinas o catelicidinas (De Smet & Contreras, 2005). Existen intermediarios evolutivos como las bacteriocinas tipo defensina que son un grupo de bacteriocinas que comparte los puentes de disulfuro en las mismas posiciones que podrían observarse en las defensinas (Baindara et al., 2016; Sugrue, O'Connor, Hill, Stanton, & Paul Ross, 2020).

Tanto las bacteriocinas como los antibióticos comparten funcionalidad biológica al ser ambas sustancias que nulifican o matan a otras poblaciones pero existen diferencias muy marcadas entre ellas puesto que las bacteriocinas son sintetizadas como metabolitos primarios mientras que los antibióticos son secundarios. El espectro de acción de las bacteriocinas es mucho más reducido que los antibióticos, éstos últimos son muy amplios. El grado de actividad es mucho más intenso entre bacteriocinas ya que su rango de acción se encuentra en el orden de los nano a micro molar mientras que los antibióticos son rango de acción está ranqueado entre los micro y milimolar. Debido a su origen proteico, las bacteriocinas son altamente propensas a ser degradados por enzimas. Sin embargo, las bacteriocinas son más termodinámicamente estables y con una actividad más amplia de pH que los antibióticos. Las bacteriocinas atacan

generalmente la membrana extracelular generando poros mientras que los antibióticos pueden atacar la membrana también y/o atacar blancos intracelulares. Se conoce que las bacteriocinas presentan baja o nula toxicidad en comparación con los antibióticos (Perez, Zendo, & Sonomoto, 2014).

### **2.5.3. Bacteriocinas utilizadas contra *S. aureus* resistentes**

En la actualidad, diversos estudios enfocados en bacteriocinas se han enfocado en su actividad contra cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos. Por ejemplo, la lisostafina fue utilizado el control de *S. aureus* ATCC 29740 (Oldham & Daley, 1991) mientras que la pentocina JL-1 ha sido efectivo para el control de *S. aureus* multirresistente (Jiang, Zou, Cheng, Fang, & Huang, 2017). La bacteriocina entianina mostró actividad contra MRSA (ATCC 43300) (S. W. Fuchs et al., 2011). La epidermicina NI01 mostró actividad contra MRSA (Sandiford & Upton, 2012). Así también como las enterocinas DD28 y DD93 con actividad anti estafilocócica contra células MRSA (Al Atya et al., 2016).

### **2.5.4. Bacteriocinas contra patógenos resistentes a los antibióticos**

Las bacteriocinas son un grupo muy bien definido de péptidos antimicrobianos que tienen su origen evolutivo en bacterias y en algunas arqueobacterias. Por sus características proteicas, las bacteriocinas son elementos genéticos que pueden ser fácilmente modificados por técnicas de Ingeniería genética (Cotter et al., 2013). Las características generales de las bacteriocinas son que su espectro de acción es actuar tanto en las bacterias Gram positivas como negativas. Su modo de actividad por actividad bactericida o bacteriostático. Su mecanismo de acción es por permeabilización de membrana creando lisis celular. Su estructura bioquímica es muy variada que pueden ser péptidos, glicoproteínas y lipoproteínas. Son de peso molecular variable, sin embargo, las bacteriocinas de origen en Gram positivas son de tamaño pequeño. Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son susceptibles al corte proteolítico y altamente estables a altas temperaturas (Heredia-Castro et al., 2017).

Entre algunas de las bacteriocinas que se han utilizado para el control de patógenos resistentes está la bacteriocina AS-48, la cual ha sido ampliamente

utilizado contra cepas de referencia y clínicas para *Mycobacterium tuberculosis* (Aguilar-Pérez et al., 2018). Otro ejemplo es la pentocina JL-1 ha demostrado tener actividad contra diferentes cepas bacterianas (Jiang et al., 2017). Entianina ha mostrado actividad contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ATCC 51299) (S. W. Fuchs et al., 2011). Las klebcinas poseen actividad contra especies resistentes y multirresistentes de cepas del género *Klebsiella* (Denkovskienė et al., 2019). La lista de bacteriocinas reportadas como efectivas contra patógenos resistentes de relevancia clínica es muy larga y que puede ser observada en la literatura correspondiente (Cui et al., 2012; Gabrielsen, Brede, Nes, & Diep, 2014; Newstead, Varjonen, Nuttall, & Paterson, 2020; Perez et al., 2014).

#### **2.5.5. Breve clasificación de las bacteriocinas**

Las bacteriocinas pueden ser producidos tanto por microorganismos Gram positivos como negativos, inclusive por miembros del dominio *Archaea* (Chikindas et al., 2018).

Hasta el día de hoy, no hemos encontrado un órgano internacional que regule la clasificación de las bacteriocinas más que lo propuesto en grupos de investigación ligados a la ciencia de las bacteriocinas. Las bacteriocinas con origen evolutivo en organismos Gram positivos están actualmente clasificados en cuatro grandes clases: la clase I corresponde a bacteriocinas modificadas postraduccionalmente de muy bajo peso molecular (<5 kDa), la clase II se refiere a bacteriocinas termoestables no modificadas de bajo peso molecular (<10 kDa), la clase III contiene bacteriocinas termosensibles de alto peso molecular (>10 kDa) y por último, la clase IV se compone de proteínas acomplejadas con carbohidratos o lípidos (Newstead et al., 2020; Perez et al., 2014)

Dada la diversidad de bacteriocinas, para fines de este trabajo, solo nos enfocaremos en las bacteriocinas tipo II de las Gram positivas, ya que se clasifican en cuatro grandes subclases. La clase IIa representa la familia de las bacteriocinas con actividad antilisteria por su actividad específica contra cepas de *Listeria monocytogenes* y además porque se mantiene un dominio conservado

YGNQV conocido como la caja de pediocina y que ubica en extremo N-terminal. Uno de los ejemplos más reconocidos es la enterocina NKR-5-3C. La clase IIb representa a las bacteriocinas compuestas por dos péptidos, que en sí son dos péptidos diferentes que actúan sinérgicamente para atacar a un blanco como lactococcin Q que se compone de los péptidos lactococcina Q $\alpha$  y lactococcin Q $\beta$ . La clase IIc se relaciona con las bacteriocinas circularizadas que están unidas de extremo a extremo como lactociclina Q y leucociclina Q. La clase IId se compone de bacteriocinas sin péptido líder y que se sintetizan sin una secuencia líder en su extremo N-terminal. Algunos ejemplos son: la weissllicina Y, weissllicina M, leucocina Q, leucocina N, lacticina Z y lacticina Q (Perez et al., 2014).

#### **2.5.6. La bacteriocina Lacticina Q**

La lacticina Q (LnqQ) es una bacteriocina que fue por vez descubierta por Fujita y sus colaboradores en el 2007. Esta bacteriocina fue aislada por primera vez por *Lactococcus lactis* QU5, una cepa Gram positiva que fue aislada de una muestra de maíz fresco recolectado en campos agrícolas de la comunidad de Aso en Kumamoto, Japón. La composición bioquímica de LnqQ es que se trata de péptido lineal compuesto por 53 residuos y con un peso molecular de 5,920.50 Da (Fujita et al., 2007). La estructura tridimensional, descubierta por Acedo y otros, revela que es una proteína globular que se compone de cuatro  $\alpha$ -hélices cuya superficie es altamente catiónica y su núcleo, hidrofóbico. Esta secuencia presenta una carga neta +6 y su pI = 10.8 (Acedo et al., 2016).

Esta bacteriocina ha mostrado ser un péptido antimicrobiano con alta efectividad contra bacterias Gram positivas, siendo antagonista de uno los principales patógenos reportados en clínicas como *S. aureus*. Por ejemplo, se han registrado diversos rangos de concentración mínima inhibitoria (MIC) de la LnqQ como 8  $\mu$ M contra *S. aureus* ATCC 6538 y 32  $\mu$ M contra *S. aureus* ATCC 29213 (Acedo et al., 2016). También se ha reportado 1.8  $\mu$ M (Fujita et al., 2007) o 10  $\mu$ g/ml (Ma, Yu, Han, Wang, & Zhang, 2012) contra *S. aureus* ATCC 12600.

Se conoce que la LnqQ genera alta permeabilidad en la membrana sin necesidad de anclarse sobre moléculas específicas como el Lípido II (Yoneyama, Imura,

Ichimasa, et al., 2009). Posteriormente, se determinó que el mecanismo de acción es a través de un modelo conocido como Poro Toroidal Enorme (HTP, *huge toroidal pore*) donde las estructuras  $\alpha$ -hélices cargadas positivamente y presentes en la LnqQ, se unen covalentemente hacia la membrana celular que está cargada negativamente y entonces genera un poro en forma de toroide enorme de 4.6 a 6.6 nm de diámetro generando una estructura conocida como *lipid flip-flop*, lo que permite el goteo de moléculas intercelular, de manera que la célula muere. La translocación del péptido desde el exterior a la cara interna de la célula, ocurre sincrónicamente con la formación del poro toroidal (Yoneyama, Imura, Ohno, et al., 2009). En un estudio a nivel *in vitro*, se determinó que cuando LnqQ es agregado a niveles MIC sobre cultivos bacterianos sensibles, aumenta la acumulación de radicales libres tipo hidroxilos y por consecuencia, la célula muere (Li et al., 2013).

#### **2.5.7. Composición genética de la LnqQ y genes asociados**

Las bacteriocinas son sustancias tóxicas que pueden atacar a su microorganismo productor si éste no cuenta con características que le permitan resistir (Ishibashi et al., 2014; Iwatani et al., 2012; Ladjouzi, Lucau-Danila, Benachour, & Drider, 2020; Mesa-Pereira et al., 2017; Nascimento et al., 2012). De manera que todos los operones de las bacteriocinas se componen habitualmente de los siguientes elementos genéticos: promotor, gen estructural (bacteriocina), genes de inmunidad, genes de transporte, una proteína accesoria y un terminador de la transcripción (Mesa-Pereira et al., 2017).

La LnqQ no es ninguna excepción a la regla, ya que similar a otras bacteriocinas, la producción, secreción y autoinmunidad está regulado por el clúster genético *InqRQBCDEF* que se encuentra en *Lactococcus lactis* QU5 y que descubierto por Iwatani y otros en el 2012 (Iwatani et al., 2012). Al día de hoy aún no está del todo bien determinado la funcionalidad de los elementos que conforman el operón pero se sabe que el clúster *InqQBCDEF* es esencial para la completa producción de LnqQ mientras que los productos LnqEF son esenciales y los productos LnqBCD



están parcialmente involucrados en la inmunidad y secreción de la bacteriocina (Iwatani, Horikiri, Zendo, Nakayama, & Sonomoto, 2013).

## **2.6. Producción heteróloga de bacteriocinas**

Entre las virtudes observadas en las bacteriocinas están en que gozan de una excelente reputación en seguridad biológica (Silva et al., 2018) y de una gran diversidad de bancos de datos sobre bacteriocinas (Hammami et al., 2010; G. Wang et al., 2016). Estos datos pueden apoyar para el diseño y construcción de bacteriocinas *de novo* (Fields et al., 2020). Sin embargo, a la fecha, una cantidad raquítica de bacteriocinas han sido capaces de ser producidos en masa siendo la nisina y la pediocina PA-1 las únicas bacteriocinas en destacar industrialmente. Una de las hipótesis que más planteada supone que las bacteriocinas no han destacado en el mercado porque éstas deben de producirse en altas cantidades y con suficiente actividad biológica y en los organismos nativos, este proceso se considera que es un desgaste energético significativo ya que el rendimiento productivo es usualmente bajo (Mesa-Pereira, Rea, Cotter, Hill, & Ross, 2018).

Desde la fundación de la Ingeniería Genética, las proteínas han sido objeto de múltiples modificaciones para aumentar su producción y purificación utilizando diversos sistemas biológicos productores desde sistemas procariotas como *E. coli* hasta sistemas eucariotas como células de levaduras o inclusive en líneas celulares eucariotas. A pesar del avance actual que existen ya en estas técnicas, la producción de proteínas puede presentar incluso problemas de rutina en laboratorios dedicados a este campo como la formación de cuerpos de inclusión, toxicidad o baja producción de proteínas (Bell, Engleka, Malik, & Strickler, 2013).

En este trabajo nos hemos enfocado en la exploración de un péptido señal N-AmyE y un péptido de fusión SmbP para la expresión heteróloga de la bacteriocina LnqQ tanto en la región periplásmica y citoplásmica de células de *E. coli*. Nuestro objetivo es que la aplicación de las etiquetas en la producción de la bacteriocina permita la producción y purificación de LnqQ en células de *E. coli* mientras mantiene su funcionalidad biológica bactericida contra cultivos de *S. aureus*. En este capítulo presentaremos antecedentes relacionados al péptido señal N-AmyE

y al péptido de fusión SmbP así como los diseños bioinformáticos utilizados para la construcción de las etiquetas con la bacteriocina, se incluyen ensayos *in silico* predictivos para estimar la estructura tridimensional de la bacteriocina con su etiqueta, así como ensayos para estimar el corte.

### **2.6.1. Péptido señal N-AmyE**

El péptido señal N-AmyE es un dominio proteico localizado en la región N-terminal de la  $\alpha$ -amilasa (AmyE) (Yang, Galiii, & Henner, 1983). Bioquímicamente, la AmyE es una enzima (1, 4- $\alpha$ -D-glucano-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) cuya función es catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos ( $\alpha$ -1,4) del almidón para producir glucosa y dextrinas (R. Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami, & Chauhan, 2003).

La secuencia nucleotídica y aminoacídica de algunas AmyE fueron reportadas desde hace varias décadas. Por ejemplo, en 1983, Yang y sus colaboradores reportaron la secuencia nucleotídica del AmyE de la cepa *Bacillus subtilis* 1A289 (Yang et al., 1983). Años más tarde en 1988, Emori y sus colegas también reportaron la secuencia nucleotídica completa de la variante producida por la cepa de *B. subtilis* 2633 (Emori & Maruo, 1988).

La existencia del péptido señal N-AmyE de la  $\alpha$ -amilasa fue propuesta por Yang y sus colaboradores cuando develaron la secuencia nucleotídica completa del mismo, argumentando que el presunto péptido señal debía tener un tamaño de 32 aminoácidos. También observaron que AmyE podría expresarse en células de otras especies como *E. coli* manteniendo su actividad biológica (Yang et al., 1983)

La utilidad biotecnológica del péptido señal N-AmyE es porque se ha reportado que es funcionalmente activo tanto en *Bacillus subtilis* como en *E. coli* ya que al fusionarse ésta con la región N-terminal de una proteína de interés biotecnológico está puede ser liberado al medio extracelular. Por ejemplo, al fusionar el péptido señal N-AmyE con una  $\beta$ -lactamasa, ésta es capaz de excretarse al medio extracelular tanto en células de *B. subtilis* como de *E. coli*. Sin embargo, el sitio de reconocimiento para el corte del péptido señal difiere entre ambos tipos de células (Nakazawa, Takano, Sohma, & Yamane, 1986). Un análisis multivariado de datos

determinó que las secuencias nucleotídicas que contienen el péptido señal N-AmyE en su sección N-terminal tienden a ser excretados en el periplasma y en la sección extracelular de *E. coli* (Sjöström, Wold, Wieslander, & Rilfors, 1987).

El mecanismo de corte hidrolítico por el que el péptido señal N-AmyE se separa de la amilasa AmyE es debido a su estructura secundaria y a la presencia de un dominio rico en alaninas (aminoácido apolar) en el extremo C-terminal de del péptido N-AmyE. Sin embargo, el patrón de corte enzimático difiere según el tipo organismo donde sea expresado, ya que el sitio de corte óptimo de este péptido se encuentra entre Ala33 y X34 cuando se expresa en *B. subtilis* pero en *E. coli*, la AmyE tiende a cortarse entre Ala31 y un aminoácido cual sea (X) (Sakakibara, Tsutsumi, Nakamura, & Yamane, 1993).

En el 2005, el péptido señal N-AmyE reportado por Yang y otros, fue acoplado en la región N-terminal de una liasa de pectina para permitir su expresión en células de *E. coli* (DE3) en la región periplásmica. Los resultados de ese estudio indicaron que se logró la excreción efectiva de la liasa de pectina al medio extracelular, espacio periplásmico, citoplasma y a nivel membranal de *E. coli* después de haber sido inducido por con IPTG (R. M. Papi, Chaitidou, Trika, & Kyriakidis, 2005).

### **2.6.2. Péptido de fusión SmbP**

La mayoría de péptidos de fusión utilizados para la expresión de proteínas recombinantes son el Dominio de Unión a Celulosa (CBD<sub>cenA</sub>), Glutación-S-Transferasa (GST), Proteína de Unión a Maltosa (MBP), tiorredoxina (TRX) y las Proteínas Modificadoras tipo Ubiquitina de Tamaño Pequeño (SUMO) (Mesa-Pereira et al., 2018) o la región citoplasmática del proteína pequeña de unión a metales SmbP (Vargas-Cortez, Morones-Ramirez, Balderas-Renteria, & Zarate, 2016) a continuación, ofrecemos más información relacionada al último péptido de fusión.

En el 2004, Barney y sus colaboradores describieron a la Proteína Pequeña de Unión a Metales en el periplasma de *Nitrosomonas europaea*. Esta proteína posee un peso molecular de 9.9 kDa y presenta una inusual cantidad de residuos de

histidina (17%) seguido de alanina (16%), glutamato (14%), glicina (11%) y lisina (9%), los cuales componen el 67% de la composición total de residuos. Esta proteína carece naturalmente de metionina y de cisteínas. Estructuralmente se trata de una unidad monomérica compuesta por 93 residuos cuya principal característica es una región compuesta de 10 repeticiones secuenciales cada una con motivo de siete aminoácidos donde el cuarto residuo es una histidina conservada; estos motivos permiten la estabilización de un núcleo hidrofóbico. Como su nombre lo establece, esta proteína posee alta afinidad a metales divalentes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y de otras valencias como  $\text{Fe}^{3+}$  (Barney, LoBrutto, & Francisco, 2004). Esta proteína ha sido utilizada para la expresión periplásmica, y posterior purificación, de Hormona de Crecimiento Humano (hGH) biológicamente activa (Perez-Perez et al., 2020).

En 2015, el dominio periplásmico de la SmbP, que corresponde a la sección más próxima al extremo N-terminal en la estructura lineal del mismo, fue removido por Vargas y sus colaboradores, manteniendo únicamente el dominio citoplasmático de la SmbP citoplasmática (SmbP). Ésta última es útil como etiqueta de afinidad para técnicas de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Esta proteína fue reportada como efectiva para la expresión citoplásmica de proteínas en *E. coli* como RFP, GFP, SHY2, NDPK2 y LovR (Vargas-Cortez et al., 2016).

Recientemente, la SmbP fue utilizada por primera vez para la producción del péptido antimicrobiano Bin1b utilizando *E. coli* como hospedero para la sobreproducción. El péptido fue sobre producido y purificado, mostrando actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* (Montfort-Gardeazabal, Balderas-Renteria, Casillas-Vega, & Zarate, 2021).

## **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1. Justificación**

La idea de diseñar y utilizar un biosensor de célula para controlar cultivos de MRSA es porque las moléculas señalizadoras del QS se han reportado como estímulos químicos para ser reconocidos como células enteras vivas modificadas

para su reconocimiento. Además de que ya se han reportado diversos biosensores completos de células que pueden producir y excretar bacteriocinas capaces de matar a microorganismos multirresistentes productores de señales QS.

La decisión de inclinarnos hacia las bacteriocinas como patógenos es porque atacan un espectro limitado de bacterias dentro de una comunidad microbiológica y no ocurre de manera simultánea en un espectro amplio como ocurre habitualmente con los antibióticos, lo que promueve una mayor probabilidad de selección de mutantes que puedan conferir resistencia. Además, las bacteriocinas están constantemente evolucionando y permiten a sus productores combatir contra patógenos de resistencia emergentes (Riley et al., 2012).

Las bacteriocinas han mostrado además ser potenciales agentes terapéuticos ya que no afectan tejidos del hospedero (Kurlenda & Grinholc, 2012). Incluso, las bacteriocinas se han administrado en concentraciones tan altas como 100 veces superiores al MIC originalmente reportado con nulos efectos citotóxicos en líneas celulares eucarióticas (Hols et al., 2019). Además, la mayoría de los productores nativos en bacteriocinas poseen un excelente historial en seguridad (Silva et al., 2018).

La propuesta de etiquetar bacteriocinas con un péptido señal es porque durante el proceso de recuperación previo a la purificación, es común encontrar una baja cantidad de proteínas y además, proteasas, que disminuyen el rendimiento productivo. Con el péptido señal, la purificación de las proteínas se simplifica porque son fácilmente recuperadas de la fracción periplásmica, seguido un choque osmótico, sin la necesidad de lisar toda la célula (Ramanan et al., 2010) mientras que la decisión de añadir péptidos de fusión en los diseños genéticos es porque se trata de etiquetas que se colocan en la región N-terminal o C-terminal de una proteína con interés biotecnológico. Estos péptidos representan un método recurrente en la sobreexpresión de bacteriocinas porque ayudan en la purificación, aumentan la expresión proteica, mejoran la solubilidad, permiten que la proteína sea producida en un estado similar al nativo, incrementan el rendimiento de producción y disminuyen su degradación (Mesa-Pereira et al., 2018).

### 3.2. Hipótesis

El diseño de un biosensor construido a base de células enteras *E. coli* modificadas pronostica indica que funcionará como alarma biológica al detectar moléculas de QS de *S. aureus*. En consecuencia, liberará un compuesto antimicrobiano con actividad específica contra el organismo blanco. El péptido antimicrobiano será validado experimentalmente a través del péptido señal N-AmyE y el péptido de fusión SmbP para la expresión heteróloga de LnqQ en *E. coli* que será producido en la región periplásmica y citoplásmica, respectivamente.

### 3.3. Objetivo General

Presentar el diseño *in silico* de un mecanismo biosensor basado en el sistema de *quorum sensing* de *S. aureus* para producir Lacticina Q y producir experimentalmente este péptido antimicrobiano tanto en la región periplásmica como citoplásmica de *E. coli*.

### 3.4. Objetivos Específicos

1. Diseñar el módulo genético biosensor para detectar la presencia externa de moléculas autoinductoras (AIP) producidos por MRSA.
2. Diseñar el módulo genético de bacteriocinas para liberar lacticina Q (LnqQ) en función a la concentración externa de moléculas AIP producidos por MRSA.
3. Diseñar un vector de expresión que contenga ambos módulos genéticos tanto biosensor como de bacteriocinas.
4. Predecir la especificidad teórica del biosensor completo de células enteras entre diferentes señales de QS.
5. Predecir la solubilidad y localización subcelular de cada una de las proteínas utilizadas para el diseño del módulo biosensor y el módulo de bacteriocina.
6. Predecir la existencia de epítomos de células tipo B y nivel de alergenicidad en la LnqQ producida en *E. coli*.
7. Diseñar el vector de expresión pETNL que contenga el péptido señal N-AmyE en conjunto con el LnqQ acoplado con una etiqueta de polihistidina.

8. Diseñar el vector de expresión pSmbP-LnqQ que contenga el péptido de fusión SmbP en conjunto con el LnqQ.
9. Construir los vectores de expresión pETNL y pSmbP-LnqQ y transformar células de *E. coli*.
10. Inducir y detectar la producción de LnqQ en la región periplásmica de células de *E. coli* transformado con el vector de expresión pETNL.
11. Inducir y detectar la producción de LnqQ en la región citoplasmática de células de *E. coli* transformado con el vector de expresión pSmbP-LnqQ.

### 3.5. Metas

En un período a tres años, nos propusimos alcanzar las siguientes metas:

- Diseñar *in silico* un sistema biosensor en *E. coli* capaz de sentir moléculas de *Quorum Sensing* producidas por *S. aureus* y producir una sustancia antimicrobiana en función a la concentración externa de las moléculas QS.
- Predecir la capacidad del péptido señal N-AmyE y del péptido de fusión SmbP para producir bacteriocinas en la región periplásmica y citoplásmica de *E. coli*, respectivamente.
- Presentar los resultados obtenidos en al menos un artículo de investigación con arbitraje internacional.
- Cumplir con éxito el examen predoctoral.
- Obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología.

### 3.6. Aportación científica

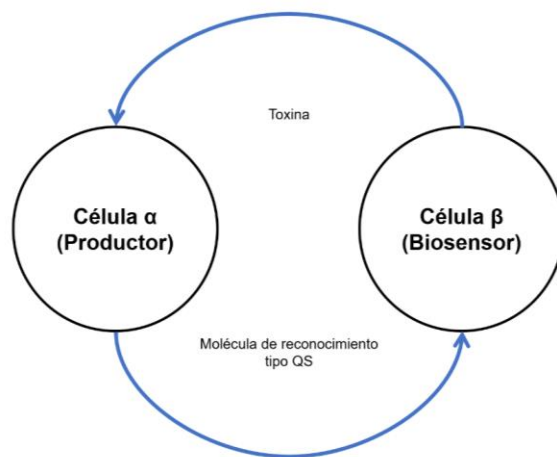
Nuestra aportación consiste en presentar el diseño y el trabajo teórico necesario para la construcción de un biosensor de células enteras basado en *quorum sensing* capaz de producir bacteriocinas en función a la concentración disponible de moléculas tipo QS, evitando así la sobreproducción y/o goteo de bacteriocinas que pueden contribuir a la resistencia en patógenos. Así también, experimentamos en péptido señal N-AmyE y al péptido de fusión SmbP para validarlos como una herramienta biológica para la producción y purificación de bacteriocinas en células modificadas de *E. coli*.

## CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Concepto del biosensor basado en células enteras

La idea de diseñar un biosensor basado en células enteras surge al yuxtaponer dos enfoques usados para tratar enfermedades resistentes a los antibióticos que es mediante el uso de organismos biológicamente activos con bacteriocinas (Allen et al., 2014)

En este sentido, tenemos dos células independientes que son reconocidas como  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente (**Figura 1**): las células  $\alpha$ , que corresponden a un productor de señales tipo QS, liberan moléculas de señalización al medio externo mientras que las células  $\beta$ , que corresponden al biosensor, son emulados para detectar moléculas de QS de las células  $\alpha$ . En respuesta a esta detección, los mecanismos internos de las células  $\beta$  producen y excretan una toxina específica contra las células  $\alpha$  y así, controlar su crecimiento poblacional.



**Figura 1. Concepto del biosensor basado en células enteras.**

*Células  $\beta$  fungen como sistema de detección y destrucción al reconocer moléculas de reconocimiento tipo QS producidos por células  $\alpha$  y causar su muerte.*

### 4.2. Cepas bacterianas

Nosotros designamos a *E. coli* (BL21) DE3 como chasis biológico porque ha sido ampliamente reconocido para la sobreproducción de bacteriocinas recombinantes (Mesa-Pereira et al., 2018). Para el diseño del módulo biosensor, optamos por



utilizar los datos anotados del genoma de la cepa *S. aureus* N315, una cepa reconocida como MRSA y que ha sido reportado como unas de las principales causas de infecciones resistentes a metilicina asociado a comunidad (CA-MRSA) y a hospitales (HA-MRSA) (Kuroda et al., 2001). Para el diseño del módulo de bacteriocina, utilizamos los datos bioinformáticos del clúster de genes *lnqQBCDEF* de *L. lactis* QU5 que permiten la producción y excreción la LnqQ, así como para su autoinmunidad (Fujita et al., 2007; Iwatani et al., 2012). Abajo se presentan los diseños de ambos módulos así como la estrategia general para su ensamblado en un vector de expresión.

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) fue seleccionada para ensayos de expresión proteica con el péptido señal N-AmyE o con el péptido de fusión SmbP. La cepa *E. coli* DH5 fue utilizada para ensayos de clonación. La cepa *E. coli* Origami fue escogida para producción de proteínas problemáticas.

Un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) fue amablemente donado por el Instituto Tecnológico de Monterrey (Monterrey, Nuevo León). La cepa de *E. coli* DH5α fue recuperada de un stock de cultivos de nuestro laboratorio en el CIBYN (Apodaca, Nuevo León). La cepa *E. coli* Origami fue compartida por el Dr. Xristo Zárate de la UANL (Monterrey, Nuevo León). Todas las cepas fueron mantenidas y crecidas en caldo LB o suplementado con agar (2%) a 37°C en condiciones aeróbicas.

#### **4.3. Diseño de módulos genéticos biosensor y de bacteriocina**

Tanto los módulos biosensor como el de bacteriocina fueron diseñados de la siguiente manera: contienen un promotor, un sitio de unión al ribosoma, gen estructural, y un terminador doble de transcripción. Los diseños fueron elaborados bajo la herramienta bioinformática SnapGene 1.1.3 en el formato correspondiente.

Todos los datos bioinformáticos utilizados para ambos diseños fueron recuperados de alguna de las siguientes bases de datos: Massachussets Institute of Technology's Registry of Standard Biological Parts (SBP) (<http://parts.igem.org/>), (Galdzicki, Rodriguez, Chandran, Sauro, & Gennari, 2011), Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa & Goto,

2000), FP Base (FPB), (<https://www.fpbbase.org/>) (Lambert, 2019) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Clark, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, & Sayers, 2016) y Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (Berman et al., 2000).

Para el diseño del módulo biosensor, usamos los datos del promotor constitutivo de *E. coli* J23110 (SBP no. BBa\_J23110) como regulador transcripcional de los genes del operón *agrC* y *agrA*. Nosotros utilizamos la secuencia nucleotídica y aminoacídica del *agrC* (KEGG no. SA1843) que se compone de 1,116 nucleótidos y 371 residuos, respectivamente, y también de la información disponible para la *agrA* (KEGG no. SA1844) que se compone de 717 nucleótidos y 238 residuos. Los sitios de unión a ribosoma (SBP no. BBa\_B0034) fueron colocados entre cada gen estructural y al final de la unidad transcriptómica se colocó un doble terminador de transcripción (SBP no. BBa\_B0015), tanto el módulo biosensor como en módulo de bacteriocina.

Para el diseño del módulo de bacteriocina, utilizamos los datos del promotor inducible P2 del MRSA para regular la expresión del clúster genético *InqQBCDEF* y el gen reportero *gfp*. Debido a que la secuencia del promotor P2 no se encontraba disponible, de manera que primero tuvimos que localizar la región en el archivo genómico de la MRSA (GenBank no. BA000018.3); los resultados de este punto serán explicados más a fondo en la sección correspondiente.

Para la sección estructural del módulo de bacteriocina, buscamos el archivo bioinformático que contuviera los genes estructurales, secreción y de auto inmunidad del clúster *InqQBCDEF* (GenBank no. AB712393.1). El archivo original fue manipulado para seccionar los elementos genéticos que pertenecen al clúster, esta información será explicada con más detalle.

Por último, usamos la secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen monomérico *gfp* (FPBase no. QKFJN) como reportero de *Aequorea victoria* (Zacharias, Violin, Newton, & Tsien, 2002). Esta proteína es monomérica posee un peso molecular en 27.0 kDa. El valor máximo de excitación es  $\lambda = 488$  nm mientras que el valor máximo de emisión es  $\lambda = 507$  nm. El coeficiente de extinción es  $56,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.4. Estrategia general para el ensamblaje de módulos**

El plásmido de AddGene (<https://www.addgene.org/>) (AddGene no. 116850) fue utilizado para la construcción *in silico* de los módulos biosensor y de bacteriocina dentro de un plásmido al cual nos referiremos a partir de ahora como plásmido Dual Biosensor Killer (DBK). Este plásmido fue diseñado en la aplicación SnapGene versión 1.1.3.

#### **4.5. Optimización de los codones nativos en las secuencias seleccionadas**

Para la optimización de los codones de todas las secuencias nucleotídicas, se utilizó la herramienta bioinformática GenSmart Codon Optimization Tool (<https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>) versión Beta 1.0. Las secuencias nucleotídicas y/o aminoácidas recolectadas para el diseño de los módulos genéticos funcionaron como datos de entrada. La aplicación fue configurada para “*Escherichia coli*” como organismo para expresión de proteínas. Es importante mencionar que solicitamos la exclusión de sitios de restricción habitualmente localizados en la región múltiple de clonación del vector de expresión pET30a(+) como: BamHI (GGATCC), BglII (AGATCT), ClaI (ATCGAT), EcoRI (GAATTC), HindIII (AAGCTT), KpnI (GGTACC), NcoI (CCATGG), NdeI (CATATG), NheI (GCTAGC), NotI (GCGGCCGC), PstI (CTGCAG), SacI (GAGCTC), SacII (CCGCGG), SalI (GTCGAC), SmaI (CCCGGG), SpeI (ACTAGT), SphI (GCATGC), XbaI (TCTAGA), XhoI (CTCGAG), XmaI (CCCGGG).

Una vez optimizadas, usamos CAI Tool (<http://genomes.urv.es/CAIcal/>) para el Cálculo del Índice de Adaptación (CAI, por sus siglas en inglés) para determinar el índice de adaptación de las secuencias nucleotídicas antes y después de la optimización. Esta herramienta utiliza la secuencia nucleotídica y el uso de codones tanto del organismo nativo como el organismo productor heterólogo (u organismo recipiente) como entradas para la optimización. De acuerdo a los autores, el índice tiene un rango de respuesta que oscila entre 0 hasta 1, donde el valor correspondiente 1 indica si la secuencia de entrada usa los codones más frecuentemente utilizados por el organismo recipiente (Puigbò, Bravo, & Garcia-Vallve, 2008). Para esta aplicación, los índices de uso de codones de cada

organismo los datos de entrada deben ser descargados y posteriormente deben ingresarse manualmente. Todos los índices fueron descargados de la base de datos *Codon Usage Database* (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>) y se descargaron para los organismos *E. coli* B (CUD no. 413997), *S. aureus* N315 (CUD no.158879), *L. lactis* subsp. *cremoris* (CUD no. 1359), and *A. victoria* (CUD no. 6100).

#### **4.6. Especificidad del biosensor por predicción de comunicación cruzada**

Se realizó un alineamiento local entre pares probando de manera independiente cada una las cuatro clases más comunes de AgrD contra la secuencia aminoacídica del AgrD del MRSA seleccionada para determinar la especificidad del biosensor y en consecuencia, la existencia de un comportamiento de comunicación cruzada. El alineamiento se realizó en la aplicación EMBOSS Water ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_water/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)) (Madeira et al., 2019). Las secuencias aminoacídicas de las cuatro clases más representativas de AgrD fueron descargadas de los datos publicados por Wang y otros (B. Wang & Muir, 2016) mientras que la secuencia de AgrD de la cepa MRSA que seleccionamos, fue recuperada de una base de datos (KEGG no. SAS066).

#### **4.7. Predicción de solubilidad de proteínas**

La solubilidad de las proteínas seleccionadas para su expresión en *E. coli* fue predicha por la aplicación Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) (Hebditch, Carballo-Amador, Charonis, Curtis, & Warwicker, 2017). La precisión general de la herramienta fue estimada en 70.6%. De acuerdo con los autores, cualquier valor de solubilidad superior a 0.45 se considera que es soluble. De esta manera, cualquier proteína con valor inferior a 0.45 se infiere que no son solubles. Es importante mencionar que esta herramienta no es útil para determinar el índice de solubilidad en proteínas membranales.

#### **4.8. Predicción de localización subcelular de proteínas**

La herramienta bioinformática BUSCA (<http://busca.biocomp.unibo.it/>) (Savojardo, Martelli, Fariselli, Profiti, & Casadio, 2018) predice la localización subcelular de

una proteína en *E. coli*. Esta aplicación nos permite distinguir entre proteínas globulares de proteínas membranales. Para fines de nuestro proyecto, nosotros configuramos a la aplicación para identificar “Prokarya – Gram negative” debido a que éste es el origen taxonómico de nuestro organismo productor heterólogo.

#### **4.9. Predicción de epítomos de células tipo B**

Las aplicaciones BediPrep 2.0 y Discotope 2.0 fueron utilizados para calcular la localización de epítomos para células tipo B. Se utilizó a la LnqQ (PDB no. 2N8P, GenBank no. AB235201.1) como dato de entrada para ambas aplicaciones. BediPrep 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) fue utilizado para identificar epítomos de células tipo B en la forma lineal del péptido. Esta herramienta fue entrenada para usar el algoritmo Random Forest para predecir si un residuo aminoacídico puede ser parte de un epítomo (Jespersen, Peters, Nielsen, & Marcatili, 2017). Mientras tanto, la herramienta Discotope 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) fue utilizado para la predicción de epítomos discontinuos de células tipo B en proteínas reportadas con estructuras tridimensionales (Kringelum, Lundegaard, Lund, & Nielsen, 2012).

#### **4.10. Predicción de alergenicidad**

La alergenicidad de la LnqQ fue evaluada en la herramienta bioinformática AllerCatPro versión 1.7 (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) la cual permite predecir si el componente es capaz de crear una respuesta alérgica tipo I mediada a la inmunoglobulina tipo E (IgE) basada en el análisis estructural lineal y tridimensional de la proteína (Maurer-Stroh et al., 2019).

#### **4.11. Diseño y análisis *in silico* de pETNL**

##### **4.11.1. Recuperación bioinformática del péptido señal N-AmyE**

El archivo que contiene la secuencia nucleotídica de la amilasa AmyE fue descargado del catálogo de GenBank (GenBank no. V00101.1). El péptido señal de este archivo fue manualmente extraído con la aplicación bioinformática SnapGene 1.1.3 siguiendo las recomendaciones de la publicación de Papi y sus colaboradores (R. M. Papi et al., 2005).

#### **4.11.2. Diseño y acoplamiento del péptido señal N-AmyE con LnqQ**

Para acoplar el péptido señal N-AmyE en la sección N-terminal de la LnqQ, se descargó el archivo nucleotídico de la LnqQ (GenBank no. AB235201.1). El acoplamiento fue manualmente resuelto utilizando la aplicación bioinformática SnapGene 1.1.0 agregando sitios de restricción y algunos nucleótidos, tomando en cuenta las recomendaciones de AddGene de dejar un espacio para asistir en la clonación molecular por PCR (<https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/>). Dos vectores de expresión basados en pET-30a(+) fueron diseñados *in silico*, donde uno de los vectores contiene exclusivamente el péptido señal N-AmyE y en el siguiente está el N-AmyE acoplado con la LnqQ.

El documento que contiene los datos genéticos del vector de expresión pETNL fue elaborado en SnapGene 1.1.3 y guardado en formato .dna y enviado a BioBasic, Inc. (Canadá) a través del tercero autorizado Productos y Equipos Biotecnológicos, S.A. de C.V. (Probiotek, Nuevo León) para su síntesis.

#### **4.11.3. Predicción de corte proteolítico de péptido señal N-AymE:LnqQ:6xHis**

El índice de predicción del corte proteolítico del péptido señal N-AmyE del conjunto LnqQ con etiqueta de polihistidina fue evaluado con la aplicación en línea SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) el cual es un servidor que determina la presencia de péptidos señales y la localización de sus sitios de corte proteolítico en proteínas de origen en *Archaea*, bacterias Gram positivas y negativas y organismos eucarióticos (Armenteros et al., 2019).

Esta herramienta puede distinguir entre tres tipos de péptidos señales típicos. El primer mecanismo es a través la vía Sec tipo I (SPI) que es conocido como el mecanismo estándar de excreción donde los péptidos señales son transportados por el translocón Sec y son escindidos por acción de la Peptidasa de Señal tipo I (*Lep*). El segundo mecanismo corresponde a la vía Sec tipo II (SPII) donde los péptidos señales lipoproteícos son transportados por el translocón Sec y cortados mediante la Peptidasa de Señal tipo II (*Lsp*). El último mecanismo corresponde a

la vía Tat donde los péptidos señales son transportados por el translocón Tat tipo y son escindidos por la Peptidasa de Señal tipo I (*Lep*) (Armenteros et al., 2019).

En la aplicación se puede elegir entre cuatro grupos de organismos para el análisis de corte predictivo los cuales corresponden a organismos eucarióticos, organismos Gram positivos, organismos Gram negativos y en tipo *Archaea*. Para fines de nuestro proyecto, dado que esta construcción fue intencionada para ser producida en células de *E. coli*, se eligió la opción para organismos Gram negativos.

Para comparar la probabilidad de corte enzimático de nuestra construcción *in silico* de N-AmyE:LnqQ:6xHis, se descargó los datos bioinformáticos de seis secuencias aminoacídicas que contienen el péptido señal N-AmyE y cuyo corte proteolítico fue demostrado experimentalmente.

#### **4.12. Diseño y análisis *in silico* del pSmbP-LnqQ**

##### **4.12.1. Recuperación bioinformática del péptido de fusión SmbP**

El archivo que contiene la secuencia nucleotídica del péptido de fusión SmbP fue amablemente cedido por el Dr. Xristo Zárate de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La secuencia nucleotídica del SmbP está contenida en un vector de expresión tipo pET30a(+) y guardado en formato .dna.

##### **4.12.2. Diseño y acoplamiento de péptido de fusión SmbP con LnqQ**

Para acoplar el péptido de fusión con la sección N-terminal de la LnqQ, se descargó el archivo genético desde la base de datos biotecnológicos. Este acoplamiento fue manualmente resulto a través de SnapGene.

El documento que contiene los datos genéticos del vector de expresión pSmbP-LnqQ fueron elaborado en SnapGene 1.1.3 guardados en formato .dna y enviado a Gene Universal Inc. (Estados Unidos) a través del tercero autorizado Distribuidora Bakterlab, S.A. de C.V. (Bakterlab, Nuevo León) para su síntesis.

#### **4.12.3. Predicción de corte proteolítico de péptido de fusión SmbP-LnqQ**

El índice de predicción del corte proteolítico del péptido de fusión SmbP del conjunto LnqQ evaluado con la aplicación en línea PeptideCutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) la cual predice sitios potenciales para ser cortados por proteasas o por sustancias químicas en una secuencia de proteína determinada (Gasteiger et al., 2005). Esta aplicación contiene una lista extensa de reacciones enzimáticas y químicas. Para fines de nuestro proyecto, se eligió la opción de “Enterokinase” ya que nuestra construcción contiene este dominio.

#### **4.13. Identificación de codones de paro en los diseños**

Para descartar que la existencia de algún codón de paro no observado durante la fase de post diseño, optamos por analizar la secuencia nucleotídica de la región de interés de pETNL y pSmbP-LnqQ en la aplicación en línea ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), la cual es una aplicación que encuentra marcos de lectura abiertos en una secuencia de nucleótidos. Los parámetros seleccionados correspondieron a “ATG” exclusivamente como codón de inicio y como código genético se utilizó la opción 1, correspondiente a “Standard”. Esta aplicación realiza una traducción de la secuencia nucleotídica a partir de la traducción de seis marcos de lectura y devuelve un gráfico que indica la ubicación donde se encuentra cada marco de lectura identificado (Wheeler et al., 2003).

#### **4.14. Predicción de peso molecular de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ**

El peso molecular estimado de los productos de los vectores pETNL y pSmbP-LnqQ fueron estimado a través de la aplicación Compute pI/MW de ExPasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) la cual permite estimar el punto isoeléctrico (pI) teórico y el peso molecular (MW) teórico a partir de secuencias reportadas o secuencias de aminoácidos ingresados por el usuario (Gasteiger et al., 2005).



#### **4.15. Predicción de solubilidad y localización celular N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ.**

La solubilidad de los productos de los pETNL y pSmbP-LnqQ fueron analizados por la aplicación Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) (Hebditch et al., 2017) mientras que la localización subcelular de las proteínas fue determinada por la herramienta BUSCA (<http://busca.biocomp.unibo.it>) (Savojardo et al., 2018).

#### **4.16. Predicción de estructura secundaria y tridimensional de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ**

Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) es una aplicación en línea para el análisis de modelado para estructuras secundarias y tridimensionales. Esta herramienta permite predecir y analizar la estructura de la proteína así como funciones y mutaciones, haciendo más fácil la interfaz al usuario para interpretar la estructura secundaria y terciaria de los modelos así como la composición de dominios y la calidad del modelo (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015).

#### **4.17. Transformación de células de *E. coli* con pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ**

##### **4.17.1. Transformación de células de *E. coli* con DNA exógeno**

Para transformar las células de *E. coli* con el vector de expresión pET30a(+), pETNL o pSmbP-LnqQ se utilizó la técnica de electroporación (Potter & Heller, 2003) que consiste en la introducción de DNA exógeno al interior de las células por métodos físico-químicos. A continuación, describimos la técnica:

Se preparó un cultivo overnight de *E. coli* en un tubo con caldo LB estéril y se incubó por 37°C en agitación constante por 18 h. Al día siguiente, 20 µl del cultivo preinóculo fueron retirados y depositados en un microtubo con 1 ml de caldo LB estéril; este proceso se realizó en seis tubos donde tres son etiquetados “Muestra” (M), “Antibiótico” (A), “Viabilidad” (V) y tres más fueron reservados para análisis espectrofotométricos. Se incubaron todos los tubos a 37°C durante aproximadamente 1.5 h (OD<sub>600</sub> entre 0.4-0.6) en agitación constante. Todos los

tubos asignados para análisis espectrofotométricos fueron usados para monitoreo. Una vez alcanzado el tiempo establecido, los tubos M, A y V fueron centrifugados a 9,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de los tubos fue descartado y las células fueron resuspendidas en 1 ml de agua ultrapura estéril a temperatura ambiente. Los tubos fueron centrifugados a 9,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió una vez. El precipitado celular en los tubos M, A y V fue resuspendido en 35  $\mu$ l de agua ultrapura estéril y se agregó al menos 2 a 3  $\mu$ l de plásmido ( $\approx$  500  $\mu$ g totales) o de agua según el caso. Finalmente, se mezcló cuidadosamente con la micropipeta.

En el tubo de viabilidad no se agregó plásmido y fue sembrado en una placa LB. En el tubo etiquetado como antibiótico no se agregó plásmido y el precipitado fue sembrado en una placa de LB suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Al tubo de control positivo se agregó un plásmido resistente a la kanamicina y ésta fue sometida a electroporación y sembrada en una placa con LB con kanamicina. En la muestra se agregó alguno de los siguientes plásmidos pET30a(+), pETNL o pSmbP-LnqQ y posteriormente fue sometido a electroporación y sembrado en una placa de LB con kanamicina

El volumen total de los tubos fue transferido a una celda de electroporación en el espacio de 2 mm. El equipo de electroporación (previamente irradiado con luz UV por 15 min) fue encendido y configurado para electroporar a 2,500 V. Posteriormente, se agregó 1 ml de caldo LB estéril a la celda de electroporación y cuidadosamente mezclado (para evitar estresar a la célula). La mezcla es tomada con mucho cuidado desde la celda y transferido a un tubo de 1.5 ml estéril. El tubo fue incubado a 37°C por 1 h en agitación muy baja. Cumplido el tiempo establecido, el tubo fue centrifugado a 9,000 rpm durante 2 min. Se retiró la mayor parte del sobrenadante ( $\approx$  950  $\mu$ l) y el restante fue mezclado suavemente con el precipitado celular hasta suspender la solución. El volumen total resuspendido fue sembrado en placas de LB agar o LB agar suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml) dependiendo el caso. Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de aerobiosis durante 16 h. Al terminar, las placas fueron revisadas y

seleccionadas. Las células efectivamente transformadas con los plásmidos fueron resistentes a la acción de la kanamicina mientras que las no transformadas fueron eliminadas. Las células transformadas fueron validadas posteriormente por técnicas moleculares como extracción de DNA plasmídico y/o identificación por producto de PCR punto final.

#### **4.17.2. Extracción y purificación de DNA exógeno de células de *E. coli***

Para la extracción y purificación, utilizamos el Isolate II Plasmid Mini Kit de Meridian Bioscience® (Estados Unidos, Cat. BIO-52056). Se preparó un cultivo overnight de *E. coli* en un tubo 5 ml de caldo LB estéril y se incubó por 37°C en agitación constante por no más ni menos de 16 h. Al día siguiente, previo al ensayo de extracción, se precalentó la solución de buffer de lavado PW1 a 50°C y la temperatura se mantuvo a esta temperatura hasta su uso. Se verificó que el buffer de lavado PW2 estuviera suplementado con etanol.

El cultivo overnight fue centrifugado a 11,000 x *g* por 30 minutos. El volumen se retiró y se mantuvo el precipitado celular al cual se agregó 250 µl del buffer de resuspensión P1 y el precipitado se resuspendió por completo por vórtex. Es importante que no quede masa celular adherida en los tubos. Posteriormente, se agregaron 250 µl de buffer de lisis P2 y se mezcló suavemente por inversión unas 6 a 8 veces. El tubo fue incubado a temperatura ambiente por 5 min o hasta que el lisado celular se tornara claro. Cumplido el tiempo anterior, se adicionaron 300 µl de buffer de neutralización P3 y se mezcló suavemente por inversión unas 6 a 8 veces. Este procedimiento fue para evitar el rompimiento del DNA genómico. Los tubos fueron centrifugados a 11,000 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Este paso fue repetido hasta que el sobrenadante quedara lo más claro posible.

Posteriormente, se tomó una columna tipo spin y sobre ésta se agregó un tubo colector y sobre ésta se añadió el volumen recuperado del paso anterior. El tubo con el volumen fue centrifugado a 11,000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante del tubo fue eliminado por decantación. Sobre el tubo colector se agregó 500 µl de buffer de lavado PW1 precalentado y se centrifugó a 11,000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante del tubo fue eliminado por

decantación. Se adicionó 600 µl de buffer de lavado PW2 (suplementado con etanol) y se centrifugó a 11,000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante del tubo fue eliminado por decantación. Centrifugar de nuevo el tubo colector a 11,000 x g por 2 min a temperatura ambiente para remover etanol residual.

Debajo del tubo colector se colocó un tubo de 1.5 ml estéril y se agregó 50 µl de buffer de elución P directamente sobre la membrana de sílice. Se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Del tubo con DNA purificado se tomaron 2 µl y se analizaron por nano-espectrofotometría para el cálculo de concentración y de pureza del DNA plasmídico.

#### **4.17.3. Oligonucleótidos para identificación de plásmidos por PCR punto final**

Para comprobar que las células de *E. coli* fueran efectivamente transformadas con el vector de expresión pET30a(+), pETNL y pSmbP-LnqQ se realizó un experimento de PCR punto final para identificar al plásmido recuperado de las células de *E. coli*. Para ello, nos enfocamos en primer lugar a elegir un par de oligonucleótidos que cumplieran de identificar los vectores de expresión.

El par de oligonucleótidos elegidos para el análisis de las construcciones corresponden al T7 promoter primer (5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3') y al T7 terminal primer (5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), los cuales son oligonucleótidos específicos para vectores construidos basados en pET30a(+). La secuencia de ambos oligonucleótidos fue recuperada de una compilación de AddGene para "Sequencing Primers" (<https://www.addgene.org/mol-bio-reference/sequencing-primers/>).

Para determinar la temperatura de fusión óptima del par de oligonucleótidos, utilizamos dos herramientas bioinformáticas en línea. La primera aplicación fue OligoAnalyzer™ (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) de la compañía Integrated DNA Technologies Inc. (Estados Unidos), donde se ajustaron parámetros como la

concentración de oligonucleótido, las concentraciones de iones monovalentes ( $\text{Na}^+$ ) y divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ) así como la concentración de nucleótidos (dNTPs) en la reacción para el cálculo de formación de hairpin, homodímeros y heterodímeros. La otra aplicación es Net Primer (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) de Premier Biosoft que también contiene puntos como la aplicación anteriormente mencionada pero contiene opciones como el cálculo de rating de éxito y estabilidad en el extremo 3'-terminal.

Para realización del ensayo de PCR punto final, utilizamos el High-Stability PCR kit (Cat. No. L00342, Manual No. 0285, Versión 08272013) de GenScript, Inc. (Estados Unidos). De esta manera, ajustamos las condiciones de reacción de PCR según lo determinado por el fabricante para la DNA polimerasa Green *Taq*. La reacción de PCR punto final se ajustó a una concentración de oligonucleótidos de trabajo para 1.0  $\mu\text{M}$ , concentración de monovalentes ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) a 50.0 mM, concentración de divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ) a 1.5 mM y concentración de dNTPs a 0.5 mM.

El protocolo general para ensayo de PCR punto final de acuerdo con el fabricante, consistió en que por cada 50  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción se agregarían 5  $\mu\text{l}$  de 10 X de Reaction Buffer, 1.0  $\mu\text{l}$  de 10 mM de dNTPs, 1.0  $\mu\text{l}$  por el oligonucleótido 5'-terminal a 20  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{l}$  por el oligonucleótido 3'-terminal a 20  $\mu\text{M}$ , 2.0  $\mu\text{l}$  de plásmido (de al menos 100 ng/ $\mu\text{l}$ ), 39.5  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura estéril y 0.5  $\mu\text{l}$  de la DNA polimerasa Green *Taq*.

#### **4.17.4. Corrida de DNA en gel de agarosa**

Las muestras obtenidas fueron procesadas en un gel de agarosa (1%, p/v) adicionada con Eco-Stain, ready to use (Cat. No. DT81413) de BioBasic, Inc. (Canadá) el cual es una sustancia que tiene un pico de excitación a  $\lambda = 490 \text{ nm}$  y dos picos de emisión  $\lambda = 520 \text{ nm}$  y  $\lambda = 635 \text{ nm}$  y esta solución se agrega al gel en una relación de 1  $\mu\text{l}$  por 20 ml de solución de agarosa. Las muestras fueron corridas durante 1 h a 100 V en cámara para electroforesis. Al terminar el tiempo establecido, el gel fue retirado e iluminado con luz UV en el transiluminador y se tomó una fotografía como evidencia. Todos los geles fueron elaborados con su respectivos controles positivos, negativos y muestras.

#### **4.18. Determinación de expresión proteica por SDS-PAGE**

##### **4.18.1. Inducción de IPTG en células de *E. coli* modificadas**

Brevemente, cultivos con diferentes cepas de *E. coli* transformados con pET30a(+), pETNL o pSmbP-LnqQ fueron inducidos con IPTG. Se realizó un cultivo preinóculo de *E. coli* BL21 (DE3) transformado en un matraz con 25 ml de caldo LB suplementado con kanamicina (conc. final 50 µg/ml) a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente se registró el valor de OD<sub>600</sub> del cultivo preinóculo. Se inoculó un volumen de cultivo preinóculo en un matraz estéril con 25 ml de caldo LB suplementado con kanamicina hasta llegar a un valor inicial de OD<sub>600</sub> ≈ 0.1. Este matraz fue incubado a 37°C en agitación constante hasta alcanzar un valor espectrofotométrico de OD<sub>600</sub> ≈ 0.4.

Una vez que cultivo cumplió con punto anterior, este cultivo fue inoculado con IPTG (concentración final 0.1 mM) y se incubó durante 16 h en dos diferentes temperaturas a 25°C y a 37°C. Cumplido el tiempo, el cultivo fue distribuido en tubos de 50 ml estériles y enviados directamente a congelación. Todos los tubos usados fueron pesados previo a su llenado con los cultivos. Los tubos fueron propiamente etiquetados.

##### **4.18.2. Extracción de proteínas periplásmicas en células de *E. coli* transformados con pETNL.**

Los cultivos de *E. coli* transformados ya fuera con pET30a(+), pETNL o pSmbP-LnqQ fueron inducidos por IPTG para la sobreproducción de proteínas. Brevemente, se realizó un cultivo preinóculo de *E. coli* BL21 (DE3) transformado en un matraz con 25 ml de caldo LB suplementado con kanamicina (conc. final 50 µg/ml) a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente se registró el valor de OD<sub>600</sub> del cultivo preinóculo. Se inoculó un volumen de cultivo preinóculo en un matraz estéril con 25 ml de caldo LB suplementado con kanamicina hasta llegar a un valor inicial de OD<sub>600</sub> ≈ 0.1. Este matraz fue incubado a 37°C en agitación constante hasta alcanzar un valor espectrofotométrico de OD<sub>600</sub> ≈ 0.4. Una vez que cultivo cumplió con punto anterior, este cultivo fue inoculado con IPTG (concentración final 0.1 mM) y se incubó durante 16 h en dos

diferentes temperaturas a 25°C y a 37°C. Cumplido el tiempo, el cultivo fue distribuido en tubos de 50 ml estériles y enviados directamente a congelación. Todos los tubos usados fueron pesados previo a su llenado con los cultivos. Los tubos fueron propiamente etiquetados.

Para la extracción de proteínas en la sección periplásmica de células se utilizó el protocolo de Santos y sus colaboradores (BD Santos et al., 2019) que es un procedimiento en un ensayo de lisozima con choque osmótico. Se descongeló los tubos a baja temperatura y posteriormente fueron centrifugados a  $8,000 \times g$  durante 15 min a 4°C. El sobrenadante de cada tubo fue eliminado y lavado dos veces con buffer PBS 1X pH 7.4 (Gibco) frío ( $8,000 \times g$  durante 10 min a 4°C). En el último lavado, los tubos con precipitado celular fueron pesados y sus pesos se registraron. Por último, se calculó la diferencia entre los tubos con precipitado celular contra los tubos cuando estaban vacíos. A cada uno de los tubos con precipitado celular se le agregó solución hipertónica frío (sacarosa 20%, trizma 20 mM, EDTA 2 mM y lisozima 20 mg/ml; pH 8.0) a una relación de 10  $\mu$ l solución hipertónica por cada mg de peso húmedo de células. Posteriormente, el contenido de cada tubo fue mezclado y fueron incubados por 40 min a 4°C. Finalizado el tiempo, el cultivo fue centrifugado a  $8,000 \times g$  durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante fue recuperado en nuevos tubos y etiquetados como “Fracción periplásmica hipertónica” y se conservaron a -20°C hasta nuevo uso. El precipitado celular es reservado. Una vez retirada la fracción anterior, los tubos con precipitado celular remanentes fueron pesados de nuevo y se agregó solución hipotónica (agua ultrapura estéril) a una relación de 10  $\mu$ l solución hipotónica por cada mg de peso húmedo de células. Posteriormente, el contenido de cada tubo fue mezclado y fueron incubados por 40 min a 4°C. Finalizado el tiempo, el cultivo fue centrifugado a  $8,000 \times g$  durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en nuevos tubos y etiquetados como “Fracción periplásmica hipotónica” y se conservaron a -20°C hasta nuevo uso. El precipitado celular se eliminado.

#### **4.18.3. Extracción de proteínas citoplásmicas en células de *E. coli* transformados con pSmbP-LnqQ**

Para la extracción de proteínas en la sección citoplásmica de células se utilizó el protocolo de Vargas y sus colaboradores (Vargas-Cortez et al., 2016) junto con recomendaciones de Pérez (D. Pérez, comunicación personal, 2021) que es un procedimiento basado en perlas de vidrio.

Se descongelaron los tubos a baja temperatura y posteriormente centrifugados a  $8,000 \times g$  durante 15 min a 4°C. El precipitado celular de los tubos fueron resuspendidos en buffer de lisis frío (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM; pH 8.0) y se agregaron 150 mg de perlas de vidrio limpios de 0.1 mm. Los precipitados celulares resuspendidos en perlas fueron mezclados por vórtex durante 1 min. Los tubos fueron centrifugados a máxima velocidad por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado con cuidado de cada tubo y fue etiquetado como “Fracción citoplásmica”.

#### **4.18.4. Obtención de fracciones solubles e insolubles para SDS-PAGE**

Para obtener las fracciones solubles e insolubles seguimos el protocolo de Santos (Byran Santos, 2017). Para la fracción soluble a partir del sedimento celular, ésta es resuspendida en 120 µl de agua ultrapura estéril y después se le agregan 40 µl de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE 4X suplementado con β-mercaptoetanol para una concentración final al 1X. La solución fue hervida durante 10 min y posteriormente centrifugada a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue separado y guardado como “Fracción soluble”. Luego, al sedimento restante se le agregaron 120 µl de solución de urea 8 M y se hierve de nuevo durante otros 10 min para solubilización de los cuerpos de inclusión. Finalmente, la solución fue centrifugada a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue separado y guardado como “Fracción insoluble”. Ambas fracciones fueron visualizadas posteriormente en los geles de SDS-PAGE.



#### **4.18.5. Preparación de gel de SDS-PAGE 16%**

Los geles de SDS-PAGE fueron preparados bajo las siguientes condiciones: se prepararon dos geles en dos tubos nuevos e independientes conocidos como lower y upper con suficiente capacidad para almacenar el volumen de cada gel. Primero se preparó el lower gel y solo hasta haber terminado ese gel, se procedió a preparar el upper gel.

Para preparar el lower gel a 16%, preparamos una reacción considerando un volumen de 10 ml. Para ello, mezclamos 3.50 ml de agua destilada, 4.00 ml de solución de Bis/Acrilamida 40% (29:1), 2.50 ml de lower buffer (para 25 ml, Tris 1.515 g, SDS 0.1 g, pH 6.8), 200 µl de APS 10% (p/v) y TEMED 20 µl. Para el upper gel a 4%, esta reacción fue montada con un volumen de 5 ml. Para ello, mezclamos 3.25 ml de agua destilada, 0.50 ml de solución de Bis/Acrilamida 40% (29:1), 1.25 ml de upper buffer (para 25 ml, Tris 4.54 g, SDS 0.1 g, pH 8.8), 100 µl de APS 10% (p/v) y 20 µl de TEMED.

Tanto la solución de Bis/Acrilamida 40% (29:1), del upper buffer y el lower buffer fueron retirados del refrigerador y atemperados a temperatura ambiente cuando menos unos 15 min antes de uso. La solución de APS a una relación de 0.1 g por 1 ml (10%, p/v) debió prepararse al momento con agua destilada limpia. Toda la cristalería usada para preparar el gel de poliacrilamida debió ser lavada con agua destilada limpia y secarse con suficiencia, evitando rayar los vidrios.

Una vez agregado el TEMED a la mezcla, la solución fue inmediatamente vertido sobre placas de vidrio. Fue necesario esperar entre 20 a 30 minutos para que completar el proceso de polimerización. En el lower gel se agregaron 200 µl de isobutanol para el upper gel, en la parte superior, se agregó un molde para pocillos. Terminado el tiempo de polimerización, se agregaron las muestras de proteínas en los pocillos del gel de SDS-PAGE. Los geles fueron puestos sobre una cámara de electroforesis vertical y sumergidos en un buffer de corrida a 1X (para 1000 ml, Tris 3 g, Glicina 14.4 g y SDS 1 g). El gel fue corrido a 150 V durante 1 a 1.5 h, dependiendo de la línea de corrida de la solución amortiguadora.

#### **4.18.6. Tinción de gel SDS-PAGE**

Previo a teñir los geles se prepararon dos soluciones. Para la solución de tinción se pesaron cuidadosamente y con guantes 50 mg de Coomassie Blue R-250 en un tubo plástico limpio para un volumen de 50 ml. Después, se agregaron 25 ml de metanol absoluto y 5 ml de ácido acético absoluto. Esta solución fue aforada hasta 50 ml con agua destilada limpia. Mantener a temperatura ambiente y en condiciones de obscuridad hasta su uso. Mientras que para la solución de destinción, se midieron 7.5 ml de metanol absoluto y 5 ml de ácido acético absoluto. Esta solución fue aforada hasta 50 ml con agua destilada limpia. Mantener a temperatura ambiente hasta su uso.

Cuando terminado el paso de corrida por electroforesis, los geles fueron cuidadosamente separados de los vidrios. El gel fue teñido con la solución de tinción durante toda la noche en agitación constante a temperatura ambiente y posteriormente fue desteñido con la solución de destinción durante el resto del día siguiente bajo las mismas condiciones previas. El gel fue puesto sobre un fondo blanco y se fotografió como evidencia.

#### **4.19. Presuntas causas de la ausencia de bandas de proteínas de interés en los geles**

La presente sección fue desarrollada posterior a la conclusión de la fase experimental con el objetivo de explicar la ausencia de bandas tanto de N-AmyE:LnqQ como de SmbP-LnqQ en los geles de SDS-PAGE. Para abordar el problema, exploramos las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, por el análisis de hidrofobicidad a través de la escala Kyte-Doolittle, un análisis de perfil aminoacídico y finalmente, a través de diferencias por su origen evolutivo.

Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas como el tamaño de proteínas, peso molecular, punto isoeléctrico, número total de residuos con carga positiva y negativa, índice alifático (AI) e índice de hidrofobicidad (GRAVY) fueron calculadas a través de ProtParam de ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/protparam-doc.html>) (Gasteiger et al., 2005). El índice alifático (AI) está principalmente afectado por los cuatro aminoácidos con cadena lateral alifático: alanina, valina,

leucina e isoleucina. El incremento del AI es directamente proporcional a la termoestabilidad en proteínas globulares (Atsushi, 1980). El índice de hidrofobicidad (GRAVY) es el resultado del promedio que representa la suma total de los valores de hidropatía de cada uno de los residuos dentro de una cadena lineal de aminoácidos dividido por el tamaño del péptido/proteína. Una proteína con valor GRAVY negativo es una proteína hidrofílica mientras que una proteína con valor GRAVY positivo es hidrofóbica (Kyte & Doolittle, 1982).

El análisis de hidrofobicidad, a través de la escala Kyte-Doolittle, fue elaborado a partir de ProtScale de ExPasy (<https://web.expasy.org/protscale/>) (Gasteiger et al., 2005). Esta herramienta permite elaborar un perfil producido por cualquier escala aminoacídica a partir de una secuencia aminoacídica. Existen 57 escalas de hidrofobicidad y/o hidrofiliidad; para fines de nuestro experimento, utilizamos la opción “Hphob. / Kyte & Doolittle”.

El mapa de calor representa el porcentaje de aminoácidos dada en una secuencia lineal de aminoácidos con el fin de elaborar un perfil aminoacídico entre los diferentes péptidos antimicrobianos que fueron efectivamente sobreproducidos por SmbP. La gráfica fue elaborada a través de Excel con datos descargados desde la aplicación ProtParam de ExPasy.

## CAPÍTULO 5. MATERIALES Y EQUIPOS

Las actividades del proyecto fueron realizadas en los Laboratorios de Biología y de Sistemas del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología y el Laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas ubicado en la División de Estudios de Posgrado, ambas infraestructuras pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A continuación se presenta un listado completo de los materiales y equipos utilizado.

### 5.1. Materiales y reactivos

Nombre	Compañía	Catálogo
Microtubos de 1.5 ml, 15 ml y 50 ml	Distintas marcas	No especificado
Cajas Petri de plástico o vidrio	Distintas marcas	No especificado
Matraces tipo Erlenmeyer	Distintas marcas	No especificado
Celdas para espectrofotómetro	No especificado	No especificado
Celdas de electroporación	No especificado	No especificado
Micropipetas (varios volúmenes)	Distintas marcas	No especificado
Medio de cultivo LB	Difco	244620
Agar bacteriológico	MCD-LAB	9011
Agua grado Biología Molecular	Invitrogen	10977-015
Kanamicina sulfato	A.G. Scientific	K-1022
Ampicilina sódica	Sigma Aldrich	A0166
Perlas de vidrio 0.1 mm	Biospec	11079101
IPTG	Bioline	BIO-37036
LDS Sample Buffer 4X	GenScript	M00676-10
SDS	IBI Scientific	IB07062
Persulfato de Amonio (APS)	BioBasic	AB0072
TEMED	Merck	110732
Glicina	BioBasic	GB0235
Bis-Acrilamida 40% (29.1:0.9)	Merck	100641
Coomasie Brilliant Blue	BioBasic	CB0038
2-mercaptoetanol	BioBasic	MB0338
Isopropanol 100%	DEQ	No especificado

Ácido fosfórico 85%	Jalmek	A1825-13
Hidróxido de sodio	DEQ	No especificado
Ácido clorhídrico	DEQ	No especificado
Alcohol metílico	DEQ	No especificado
Ácido acético glacial	Jalmek	A0925-13
Etanol anhidro	Jalmek	E5325-18
Urea	BioBasic	UB0148
Buffer de fosfatos salinos 1X (PBS)	Gibco	10010-023
Cloruro de sodio	Jalmek	S2325-05
Tris	BioBasic	TB0196
Glicerol	DEQ	No especificado
Guantes de nitrilo	Ambiderm	No especificado
Solución estándar amortiguadora pH 4	J. T. Baker	S657-02
Solución estándar amortiguadora pH 7	J. T. Baker	S656-02
Solución estándar amortiguadora pH 4	J. T. Baker	S655-02
QuickClean II Plasmid Miniprep kit	GenScript	L00420-100
QuickClean II Gel Extraction Kit	GenScript	L00418-100
QuickClean II PCR Purification Kit	GenScript	L00419-50

## 5.2. Equipos de laboratorio

### USO PERSONAL

Nombre	Compañía	Catálogo
Computadora personal	Acer	Aspire A515-51

### LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y DE SISTEMAS

Nombre	Compañía	Catálogo
Incubadora estática	Lab Companion	IB-11E
Incubadora de piso con agitación	Lab Companion	IS-971
Incubadora de agitación (microtubos)	Eppendorf	ThermoMixer C
Horno de secado	Shel Lab	SGO 6E
Horno de microondas	Everstar	P90D23AL-XF
Concentrador	Thermo Fisher	SpeedVac SPD

Baño de ultrasonido	VMR	Symphony 97043-996
Contador de colonias	Reichert	3327
Agitador orbital	Labnet	Orbit 1000
Agitador vertical	Thermo Scientific	Compact Digital Rocket
Termociclador	miniPCR	Mini8
Termociclador	Techne	3Prime
Refrigerador de puertas deslizantes	Thermo Scientific	MH45PA-GAEE-TS GPR Series
Refrigerador a dos puertas	Norlake Scientific	LRF 201WW
Congelador de -20 °C	MetalFrio Solutions	No especificado
Espectrofotómetro UV-Vis	Optizen	2120 UV Plus
Nanoespectrofotómetro	BioSpec	Shimadzu
Gabinete bioseguridad clase II	Labconco	Delta Series
Centrífuga para microtubos	Ohaus	Frontier 5515
Centrífuga de piso	Thermo Scientific	Sorvall Legend XFR
Vórtex	Scientific Industries	Genie 2
Plancha de calentamiento con agitación magnética	Lab Companion	HP-3000L
Microscopio óptico	Fisher Scientific	Micromaster
Autoclave	Lab Companion	ST-G Series
Cámara profesional	Canon	EOS M10
Transiluminador	Maestro	No especificado
Balanza analítica	AND	GR-200
Balanza semianalítica	Ohaus	Traveler
Electroporador	Eppendorf	Eppendorf
Fuente de Poder	BioRad	PowerPac Basic
Potenciómetro	Ohaus	Starter 5000

## LABORATORIO DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Nombre	Compañía	Catálogo
Cromatógrafo	GE Life Sciences	Äktaprime Plus
Centrífuga de piso	Thermo Scientific	Sorvall Legend XFR

### 5.3. Lugares de experimentación

Nuestro proyecto fue elaborado entre Febrero de 2018 a Mayo de 2021 y fue mayoritariamente realizado en las instalaciones del **Laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas** (LBSS) a cargo del Dr. Héctor Javier Amézquita García, encontrándose en el interior del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN), dependencia de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El centro está ubicado en la autopista al Aeropuerto “Mariano Escobedo” Km. 10, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT), C.P. 66628 en Apodaca, Nuevo León, México.

En menor proporción, nuestro trabajo también fue realizado en el **Laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas** (PEP) a cargo del Dr. Xristo Zárate Kalfópulos. Esta unidad está localizada en el interior de la División de Estudios de Posgrado (DEP) de Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). La ubicación de la división está en la calle Vicente Guerrero s/n, Col. Treviño, C.P. 64570 en Monterrey, Nuevo León, México.

### 5.4. Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos

#### **Declaración de manejo y disposición de residuos**

Todos residuos generados durante la realización del proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo con las características de estos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

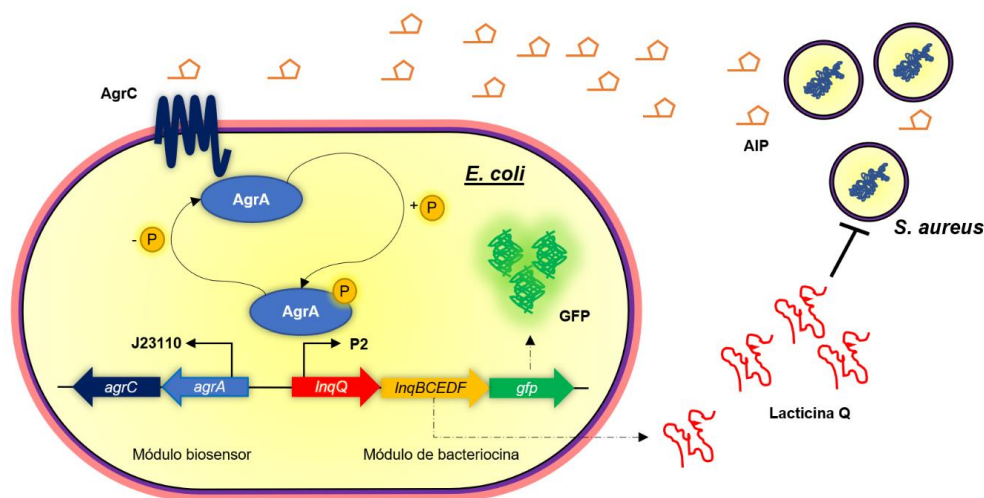
Los residuos biológico-químicos fueron dispuestos en los contenedores correspondientes en el interior de los laboratorios.

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Concepto del biosensor basado en células enteras

En esta sección nos centramos en el diseño *in silico* de células de *E. coli* configuradas para detectar moléculas de AIP producidos por el sistema nativo de QS de células de MRSA. De acuerdo con nuestro diseño (**Figura 2**), las células  $\alpha$  corresponden a células de *S. aureus* productoras de moléculas AIP mientras que las células  $\beta$ , corresponden a células de *E. coli* que han sido modificadas con un par de módulos genéticos: biosensor y bacteriocina que le permiten detectar moléculas de AIP y en respuesta, destruyen células de *S. aureus* en el medio. A manera de resumen, las células de *E. coli* modificadas producen y excretan LncQ en función de la concentración externa de moléculas de AIP.

Nuestra determinación por elegir bacteriocinas como sustancias antimicrobianas para nuestro sistema biosensor se explica en la siguiente numeración: en primer lugar, consideramos que debido a su origen proteico son susceptibles a modificaciones genéticas (Cotter et al., 2013).



**Figura 2. Sistema QS para detección y eliminación de *S. aureus*.**

El módulo biosensor conformado por *agrC* y *agrA* (azul marino y azul celeste, respectivamente) está regulado por el promotor constitutivo J23110. La detección del AIP-II (pentágonos, naranja) está regulado por AgrC, la cual activa la fosforilación (círculos, amarillo) de AgrA y activa la expresión del módulo bacteriocina a través de la *lnqQ*, *lnqBCEDF* y *gfp* (rojo, amarillo y verde, respectivamente) regulado por el promotor P2. *lnqQ* destruye células de *S. aureus*.

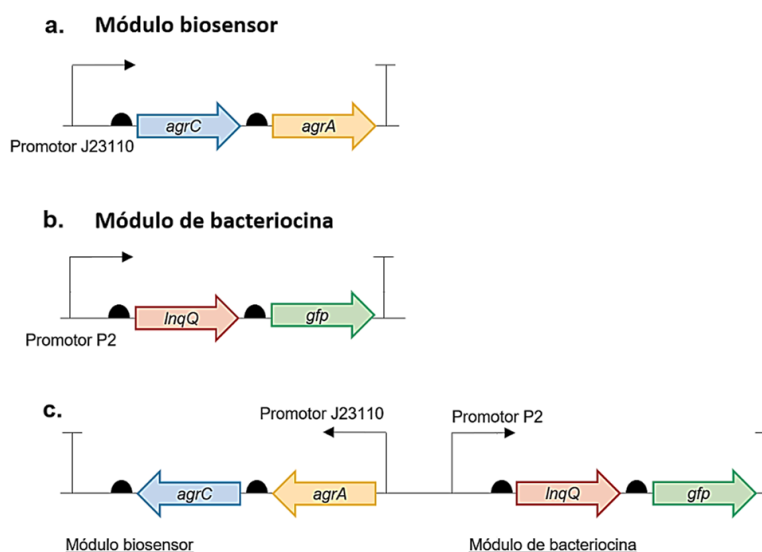


## 6.2. Cepas bacterianas

La razón de escoger a *E. coli* como chasis biológico de producción es porque ya ha sido reportado previamente como biosensor de células enteras basados en detección del QS (Sedlmayer, Hell, Müller, Ausländer, & Fussenegger, 2018) y además porque es el organismo de producción heteróloga más usado en el campo de las bacteriocinas (Mesa-Pereira et al., 2018). Nuestro modelo está diseñado para ser aplicado en *E. coli* BL21 (DE3) ya que ha sido efectivamente reportado para producir y secretar bacteriocinas de las clases Ila y IId, éste último es importante ya que esta es la clase a la que pertenece la bacteriocina LnqQ (Mesa-Pereira et al., 2017).

## 6.3. Diseño de los módulos biosensor y de bacteriocina

Para determinar el comportamiento *in silico* de nuestra célula de *E. coli*, fue necesario diseñar un vector de expresión con dos módulos genéticos y éstos fueron referidos como módulo biosensor y módulo de bacteriocina, respectivamente. Ambos módulos fueron diseñados de la siguiente manera: promotor-RBS-gene(s) estructural(es)-doble terminador (**Figura 3**).



**Figura 3. Módulos biosensor y de bacteriocina.**

El módulo biosensor es configurado con *agrC* y *agrA* y están regulados transcripcionalmente por el promotor J23110 (A). El módulo de bacteriocina está armado con los genes *lnqQ* y *gfp* y están regulados

transcripcionalmente por el promotor P2 (B). Por último, se muestra el diseño del sistema detectar y destruir con los promotores divergentes, J23110 y P2 (C).

En primera instancia, se debió localizar el locus genético del promotor P2 de nuestra MRSA fue manualmente localizado puesto que no existía información relacionada al mismo. De acuerdo con Shao y otros, el locus de un promotor se encuentra evolutivamente conservado entre especies que están relacionadas (Shao, Price, Deutschbauer, Romine, & Arkin, 2014). De esta manera, utilizamos la anterior premisa para localizar el promotor P2: en un primer enfoque, localizamos la secuencia nucleotídica del *agrB* en el archivo genómico de la MRSA (564 nucleótidos, KEGG no. SA1842) como referencia ya que se conoce que este gen es conocido que ésta es la primera unidad transcripcional ubicada río abajo del promotor P2 (Reynolds & Wigneshweraraj, 2011). Para el segundo enfoque, usamos la información disponible del promotor P2 de *S. aureus* NCTC 8325 (Rajasree, Fasim, & Gopal, 2016; Reynolds & Wigneshweraraj, 2011), una cepa catalogada como estándar para estudios bioinformáticos (S. Fuchs et al., 2017; Herbert et al., 2010). Al combinar lo mejor de ambos enfoques, logramos localizar la composición nucleotídica del promotor P2 y su tamaño a través de la identificación de los dominios.

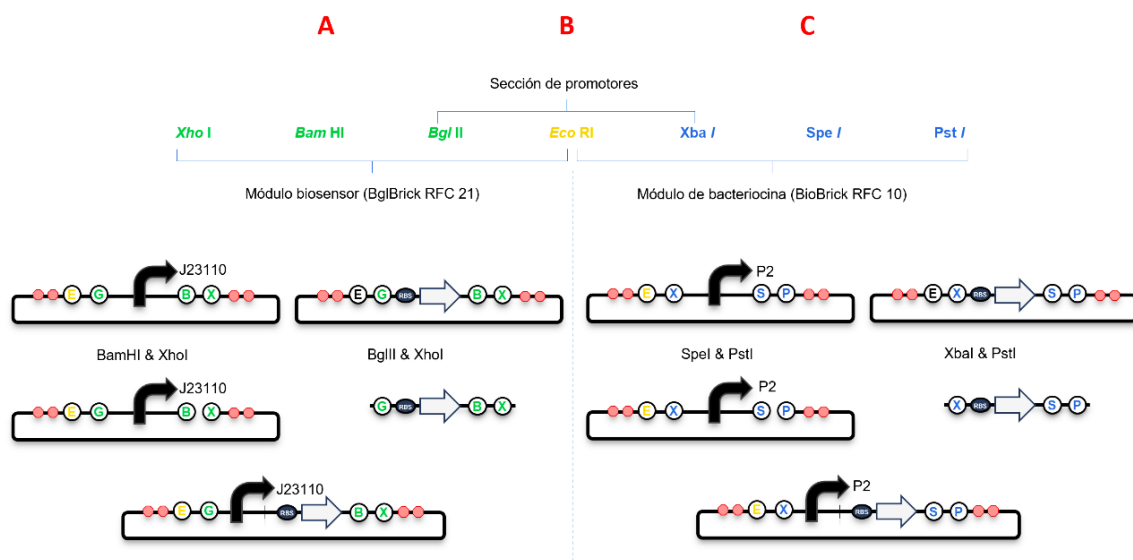
A continuación, explicamos el principio del diseño de ambos módulos. En primer lugar, el módulo designado como biosensor, los genes *agrC* y *agrA* son constitutivamente expresados por acción del promotor J23110. Brevemente se describe el principio del diseño donde inicialmente el AgrC anclado a membrana de *E. coli*, detecta la presencia de moléculas de AIP externas (Marchand & Collins, 2013). De esta manera, AgrC sufre de un cambio conformacional y fosforila al factor de transcripción AgrA. Después, el AgrA fosforilado (AgrA-P) actúa como factor de transcripción del promotor P2 (Reynolds & Wigneshweraraj, 2011). Una vez que AgrA-P se ha acoplado al promotor P2, el módulo de bacteriocina es expresado, incluyendo los genes tipo estructural (*lnqQ*), excreción y autoinmunidad (*lnqBCEDF*) del operón *lnq* así como del gen reportero *gfp*.

Algunos autores han demostrado que mantener intacto el operón nativo de una bacteriocina cualesquiera (es decir, que contenga los elementos genéticos de su estructura, para su secreción y para autoinmunidad) en *E. coli*, ésta célula modificada es capaz de excretar bacteriocinas Gram positivos al medio extracelular (Mesa-Pereira et al., 2017).

#### **6.4. Estrategia general para el ensamblaje de módulos**

Los módulos genéticos fueron diseñados para operar en el mismo sentido que el ensamble por tipo BioBrick al yuxtaponer las propiedades del BioBrick (RFC 10) y el BglBrick (RFC 21). La intención del diseño es que nuestros módulos genéticos sean fácilmente ensamblados o removidos por técnicas como In-Fusion (Sleight, Bartley, Lieviant, & Sauro, 2010) o ensamblado por clonación *in vivo* (García-Nafría, Watson, & Greger, 2016) dado que los sitios de restricción actúan como sitios homólogos para la clonación.

Cada módulo está flanqueado por sitios de restricción para que puedan ser intercambiados, de ser necesario. El módulo de promotores está flanqueado por los sitios de restricción BglII y XbaI, manteniendo a EcoRI como unidad neutral para cuando sean necesario el intercambio de piezas. Los elementos del módulo biosensor están flanqueados por los sitios BglII y BamHI y los elementos del módulo de bacteriocinas están rodeados por los sitios de restricción XbaI y SpeI (**Figura 4**)

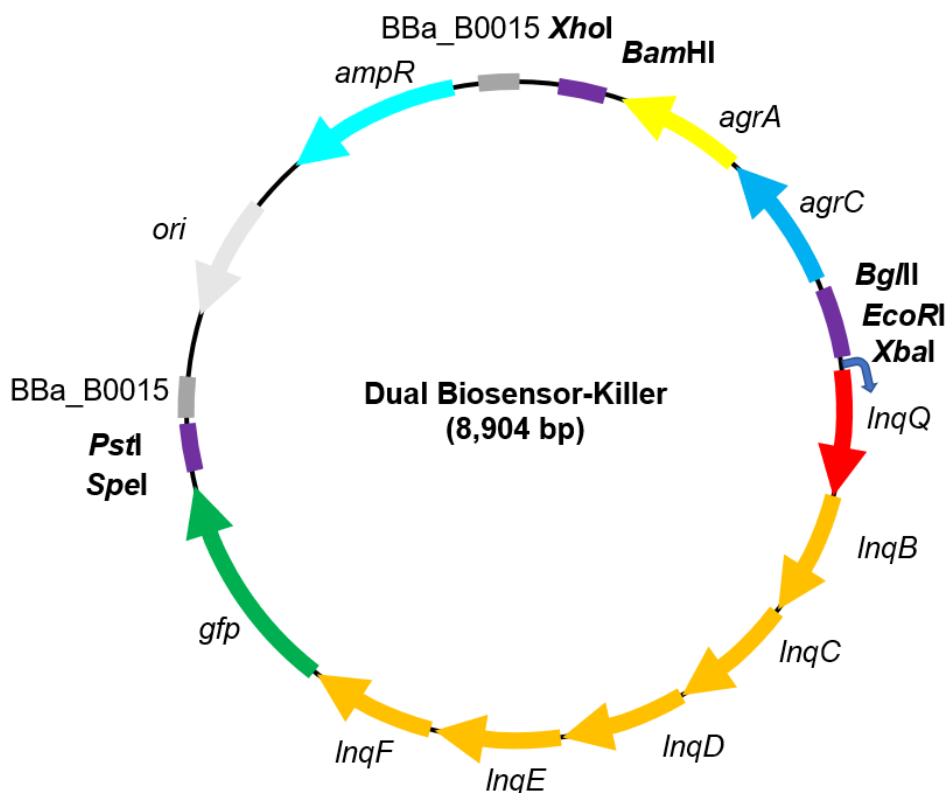


**Figura 4. Estrategia de construcción in silico.**

El módulo biosensor (sección A) está constituido por el BglBrick RFC21 mientras que el módulo bacteriocina (sección C) está representado por el BioBrick RFC10. La sección de promotores (sección B) fue colocado en caso de que los promotores fueran cambiados. Cada bloque contiene una región prefijo y otra sufijo y cada bloque está flanqueado en ambas direcciones por terminadores dobles de transcripción (BBa\_B0015, círculos rojos). La sección B está bordeada por los sitios de restricción BglII y XbaI (G-X) con la región EcoRI como neutral. La sección A, EcoRI y BglII (E-G) están anclados como prefijos mientras que BamHI y XhoI (B-X) están puestos como sufijos. Los sitios de restricción BglII y BamHI fueron usados para construir el promotor constitutivo J23110 en conjunto a su parte estructural (RBS-gen) para el módulo de biosensor. Por otro lado, para la sección C, el prefijo está compuesto por los sitios EcoRI-XbaI (E-X) y los sitios SpeI-PstI (S-P) son colocados como prefijos. Los sitios de restricción XbaI y SpeI fueron usados para construir el promotor inducible P2 y en conjunto a su parte estructural (RBS-gene) para el módulo de bacteriocina.

El plásmido pSB1A3 (AddGene no. 116850) (Dupin & Simmel, 2019) sirvió como plantilla para la construcción de los módulos genéticos. Las secciones prefijo y sufijo fueron manualmente reemplazados por cualquiera de los módulos diseñados. El replicón y los genes de resistencia a antibiótico del plásmido fueron retenidos pero el terminador de transcripción fue reemplazado por terminadores dobles. Finalmente, un par de plásmidos fueron construidos y cada uno contiene individualmente del módulo de biosensor o de bacteriocina, respectivamente. Finalmente, ambos plásmidos fueron manualmente mezclados para crear un

plásmido que contiene un par de módulos que están en direcciones divergentes. Este vector de expresión fue nombrado Dual Biosensor-Killer (**Figura 5**).



**Figura 5. Representación esquemática del vector Dual Biosensor-Killer**

*El módulo biosensor contiene los genes agrC y agrA y está rodeado por los sitios de restricción EcoRI, BglII y XhoI mientras que el módulo de bacteriocina contiene los genes del clúster InqBCDEF y el gen reportero gfp y está flanqueado por los sitios de restricción EcoRI, XbaI, SpeI y PstI. Este plásmido contiene un marcador de resistencia a ampicilina y se compone de un total de 8,904 pb.*

Parte de la estrategia de nuestro diseño consistió en que los promotores J23110 y P2 fueran colocadas en sentidos opuestos para regular de manera independiente la actividad de los módulos biosensor y de bacteriocina, respectivamente. La razón de aislar ambos módulos es para evitar la expresión por goteo que pudiera existir por efecto de la fuerza de alguno de los promotores al mantenerse en la misma dirección transcripcional (Lubkowitz et al., 2018). Todos los archivos generados para la elaboración del vector de expresión Dual Biosensor-Killer fueron

elaborados por SnapGene y están disponibles en los archivos anexos de esta misma tesis.

## 6.5. Optimización de los codones nativos

De acuerdo con las observaciones (**Tabla 1**), todas las secuencias fueron optimizadas para ser expresadas en *E. coli* cepa tipo B. Nótese, que los sitios de restricción típicos y los codones de paro de todas las secuencias utilizadas fueron removidos. El índice CAI antes de la optimización en AgrC, AgrA, LnqQ, LnqB, LnqC, LnqE, LnqD y LnqQ era de 0.407, 0.402, 0.532, 0.525, 0.518, 0.511, 0.503 and 0.521, respectivamente. Después de la optimización, los valores cambiaron a 0.770, 0.766, 0.675, 0.735, 0.771, 0.773, 0.777 y 0.747, respectivamente. El valor CAI para la GFP no pudo ser determinado por la aplicación antes de la optimización pero sí después de la optimización, el cual correspondió a 0.759. En relación con el contenido de GC%, los valores antes de la optimización fueron 28.2%, 27.2%, 33.3%, 22.5%, 23.1, 30.5% y 24.5%, respectivamente. Después de la optimización, los datos fueron 43.3%, 44.6%, 46.9%, 40.0%, 42.1%, 41.0%, 43.1%, 42.4% y 42.4%, respectivamente. El contenido GC% para GFP después de la optimización fue de 49.1%.

Nuestros resultados el promedio del valor CAI y el promedio de contenido GC% de todas las secuencias aminoacídicas antes de ser optimizadas era de  $0.49 \pm 0.05$  y  $26.90 \pm 3.71\%$ , respectivamente. Después de la optimización, los valores promedio fueron  $0.75 \pm 0.03$  y  $43.61 \pm 2.87$ , respectivamente. Según las especificaciones de la aplicación, si el valor CAI es más cercano a 1, éste indica que la secuencia de nucleótidos utiliza los codones más utilizados por el organismo productor heterólogo (Puigbò et al., 2008). Según los resultados, los valores CAI y el contenido GC% de todas las proteínas utilizadas como datos de entrada fue substancialmente mejorados y está optimizada para ser utilizado en *E. coli* heteróloga. La finalidad de optimizar el contenido nucleotídico de las secuencias utilizadas para diseño a las características requeridas del hospedero es para incrementar el rendimiento de producción (Puigbò et al., 2008).

**Tabla 1. Uso de codones previo y después de la optimización.**

Parámetros		Previo a la optimización		Después de la optimización	
Gen	Tamaño (pb)	CAI	GC%	CAI	GC%
<i>agrC</i>	1,116	0.407	28.2	0.770	43.3
<i>agrA</i>	717	0.402	27.2	0.766	44.6
<i>InqQ</i>	162	0.532	33.3	0.675	46.9
<i>InqB</i>	240	0.525	22.5	0.735	40.0
<i>InqC</i>	480	0.518	23.1	0.771	42.1
<i>InqE</i>	1,299	0.511	25.9	0.773	41.0
<i>InqD</i>	678	0.503	30.5	0.777	43.1
<i>InqF</i>	795	0.521	24.5	0.747	42.4
<i>gfp</i>	NA	NA	NA	0.759	49.1

*El índice de adaptación (CAI) y el contenido de guanidina y citosina (GC%). La tabla se divide en dos secciones: previo a la optimización y después de la optimización. La columna de gen representa el nombre del dato de entrada y el tamaño que indica el total de nucleótidos para cada entrada. Los resultados en la tabla representan la adaptabilidad de las secuencias de entrada usando a E. coli como hospedero. No fue posible determinar el uso de codones antes de la optimización para el gen gfp debido a que no hay suficiente información al computador el índice CAI con esta tabla de referencia. NA = No Aplica.*

## 6.6. Especificidad de biosensor por predicción de comunicación cruzada

Es conocido que *S. aureus* posee cuatro grandes variantes de clases de moléculas de AIP (desde I hasta IV) la cual difiere entre uno a dos residuos en la sección madura del AIP (Ji et al., 2005; B. Wang & Muir, 2016). La diferencia estructural entre las clases de AIP pueden actuar como inhibidores competitivos del QS cuando interactúan con cepas filogenéticamente relacionadas. Este fenómeno biológico es conocido como comunicación cruzada (Everett & Rumbaugh, 2014).

Para predecir la probabilidad de comunicación cruzada de nuestro biosensor, descargamos las secuencias aminoacídicas de las cuatro variantes más

representativas de AgrD junto la información anotada del AgrD de la cepa MRSA estándar. Finalmente, realizamos un alineamiento local bajo la herramienta EMBOSS Water entre cada una de las secuencias aminoacídicas representativas contra la secuencia aminoacídica de nuestra cepa. Los resultados revelan (**Tabla 2**) que el AgrD de nuestro MRSA tuvo un porcentaje de identidad y de similitud con el AgrD clase I de 47.8% y 65.2%, respectivamente. Para la clase II, los porcentajes fueron 100% y 100%, respectivamente mientras que con la clase III, fueron de 32.6% y 50.0%, respectivamente. Finalmente, con la clase IV, los porcentajes fueron de 45.7% y 60.9%, respectivamente. Según los resultados del alineamiento, podemos inferir que nuestro biosensor es útil para detectar moléculas de QS producidos por *S. aureus* N315 y por otros *S. aureus* que sean productores de AIP tipo II. Al mismo tiempo, nuestro sistema estaría limitado a no detectar *S. aureus* productores de AIP clases I, III y IV.

Bajo la predicción anterior, nuestro biosensor completo de células estaría capacitado para detectar células de *S. aureus* N315, inclusive cepas de *S. aureus* USA100, las cuales son productoras naturales de moléculas de AIP clase II (Grundstad et al., 2019) y están señaladas como entre las principales cepas tipo MRSA que circulan a nivel mundial; esta cepa es altamente letal y es una causa de endocarditis infecciosa en la válvula nativa del corazón. A nivel *in vitro*, se reporta que es una productora de biopelículas fuertes (King, Kulhankova, Stach, Vu, & Salgado-Pabón, 2016). A pesar de ser una cepa principalmente asociada a infecciones adquiridas en hospitales (Limbago et al., 2009; Tenover et al., 2008), también se ha encontrado entre individuos que no han recibido cuidados médicos previos. Nótese que esta cepa es resistente a vancomicina (Roberts, 2013).



**Tabla 2. Predicción de comunicación cruzada.**

Clase AIP	Alineamiento de proteínas	Tamaño	ID	Similitud	Gaps	Score	Ref.
I	MNTLFNLFDFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVPKELTQLHE-	46	47.8%	65.2%	0.0%	17.00	1, 2
II	MNTLVNMFFDFI IKLAKAIGIVGGVNACSSLFDEPKVPAELTNLYDK	47	100.0%	100%	0.0%	240.00	1, 2
III	MKKLLNKVIELLVDFNSIGYRAAYINCDFLLDEAEVPKELTQLHE-	46	32.6%	50.0%	0.0%	72.00	1, 2
IV	MNTLYKSFFDFITGVLKNIGNVASYSTCYFIMDEVEIPKELTQLHE-	46	45.7%	60.9%	0.0%	105.00	2
MRSA	MNTLVNMFFDFI IKLAKAIGIVGGVNACSSLFDEPKVPAELTNLYDK	-	-	-	-	-	

*El alineamiento de proteínas se realizó entre las cuatro clases mayoritarias de AIP contra el MRSA. El alineamiento fue realizado en el programa Clustal Omega mientras que la identificación (ID), similitud, gaps y score fue determinado de la aplicación EMBOSS Water.*

---

1. (B. Wang & Muir, 2016)

2. (Ji et al., 2005)

## 6.7. Predicción de solubilidad de proteínas

El análisis de solubilidad y localización subcelular entre todas las secuencias aminoacídicas utilizadas para construir biosensor de células enteras es necesario para obtener un alto rendimiento productivo (Ghosh et al., 2004). Según los resultados obtenidos por la aplicación Protein-Sol (**Tabla 3**) para predicción de solubilidad, éstos indican que LnqQ, LnqF, AgrA y GFP son considerados solubles mientras que los datos obtenidos para LnqB, LnqC y LnqE no pudieron ser considerados ya que la aplicación los clasificó como proteínas de membrana.

**Tabla 3. Predicción de solubilidad de proteínas.**

Gen	Índice	Solubilidad
AgrC	0.366	Inválido
AgrA	0.514	Soluble
LnqQ	0.655	Soluble
LnqB	0.655	Inválido
LnqC	0.644	Inválido
LnqD	0.388	Inválido
LnqE	0.609	Inválido
LnqF	0.607	Soluble
GFP	0.592	Soluble

*De acuerdo con la aplicación Protein-Sol reporta que cualquier valor de solubilidad con superior a 0.45 es considerado soluble. Los datos que fueron considerados como inválidos con un índice superior de 0.45 es porque se consideraron proteínas de membrana y son inválidos para esta herramienta.*

## 6.8. Localización subcelular de proteínas

De acuerdo con las predicciones de la aplicación BUSCA (**Tabla 4**), la localización subcelular de las proteínas AgrA, LnqQ, LnqE y GFP es en el citoplasma, mientras que AgrC, LnqB, LnqC, LnqD, LnqE y LnqF son producidos en la membrana plasmática. Los cálculos predictivos en las proteínas a sobreproducirse en *E. coli* concuerda con lo observado en la literatura: para los elementos genéticos del módulo biosensor, el AgrC actuaría como una proteína transmembranal con

actividad histidina quinasa mientras que AgrA actuaría como factor de transcripción que se mueve a través del citoplasma para anclarse al promotor P2 (Gomes-Fernandes et al., 2017). En los elementos del módulo de bacteriocina se espera que la LnqQ actúe como una proteína soluble de bajo peso molecular que es producido y excretado al medio extracelular (Fujita et al., 2007). Para los demás elementos estructurales de este módulo, se sabe que LnqB es una proteína membranal tipo permeasa, mientras que LnqC y LnqD son proteínas con dominios franqueados en membrana, así como LnqE y LnqF son proteínas transportadoras tipo ABC-2 y ABC, respectivamente (Iwatani et al., 2012). Por último, los valores de predictivos indican que la GFP será producida como una proteína soluble y monomérica (Zacharias et al., 2002).

**Tabla 4. Predicción de localización subcelular de proteínas**

Gen	Valor	Localización subcelular
AgrC	0.75	Membrana plasmática
AgrA	0.7	Citoplasma
LnqQ	0.7	Citoplasma
LnqB	0.9	Membrana plasmática
LnqC	0.83	Membrana plasmática
LnqD	0.72	Membrana plasmática
LnqE	0.86	Membrana plasmática
LnqF	0.7	Citoplasma
GFP	0.7	Citoplasma

*De acuerdo con la aplicación BUSCA, las localizaciones subcelulares disponibles son membrana plasmática y citoplasma.*

## 6.9. Predicción de epítomos de células tipo B

La determinación de la alergenicidad es un aspecto deseado durante la construcción del biosensor de células enteras debido a que nuestro sistema sería presentado en el futuro como un potencial candidato a agente terapéutico. Para demostrar este punto, fue necesario demostrar que la estructura tanto primaria

como secundaria de la LnqQ presentaba epítomos para células tipo B, dado que la alergenicidad está mediada tanto por células. De acuerdo con los resultados de la secuencia aminoacídica de la LnqQ en su estructura en forma lineal (**Tabla 5**), se indica que los potenciales residuos epítomos corresponden a E13, S16-V19 y W21-D31. Mientras tanto, los análisis realizados por la aplicación Discotope 2.0 a la secuencia aminoacídica en su forma tridimensional indican que no se encontraron residuos potencialmente epítomos para células B ni se determinaron sitios de alergenicidad.

**Tabla 5. Predicción de epítomos de células B en LnqQ**

<b>Epítomos</b>	.....E...EEEE.EEEEEEEEEEEEE.....
<b>Secuencia lineal</b>	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIWVVSQIKQILGIK
<b>Estructura</b>	CCHHHHHHHHHHHHCCCHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC
<b>Superficie</b>	EEEEEEBEBBBEBEEEEBEBBBEEEEEBEBBBEBBBBEBBBBEBBBEEEEEEEE

*La predicción fue resuelta en la aplicación BediPrep. En la sección de epítomos, si la posición está arriba de 0.5 entonces es marcado con una letra “E”. La aplicación anexa NetsurfP fue usada para la predicción estructural a partir de secuencia lineal y se divide en tres categorías: “H” para hélice, “E” para hoja y “C” para cadena. En la sección de superficie se divide en dos secciones: “B” para indicar que el aminoácido está orientado hacia el interior de la proteína (burial) mientras que “E” para indicar que el aminoácido está orientado hacia el exterior de la proteína (exposed).*

Las aplicaciones BediPrep 2.0 y Discotope 2.0 fueron utilizados para calcular la localización de epítomos para células tipo B. Se utilizó a la LnqQ (PDB no. 2N8P, GenBank no. AB235201.1) como dato de entrada para ambas aplicaciones. BediPrep 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) fue utilizado para identificar epítomos de células tipo B en la forma lineal del péptido. Esta herramienta fue entrenada para usar el algoritmo Random Forest para predecir si un residuo aminoacídico puede ser parte de un epítomo (Jespersen, Peters, Nielsen, & Marcatili, 2017). Mientras tanto, la herramienta Discotope 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) fue utilizado para la predicción de epítomos discontinuos de células tipo B en proteínas reportadas con estructuras tridimensionales (Kringelum, Lundegaard, Lund, & Nielsen, 2012).

## **6.10. Predicción de alergenicidad**

De acuerdo con el reporte realizado por la aplicación AllerCatPro, la bacteriocina LnqQ no posee elementos alergénicos.

## **6.11. Diseño y análisis *in silico* de pETNL**

### **6.11.1. Recuperación bioinformática del péptido señal N-AmyE**

El péptido señal N-AmyE fue seleccionado porque se ha demostrado que los primeros 33 residuos de la  $\alpha$ -amilasa (AmyE) de *B. subtilis* pueden ser acoplados a la región N-terminal a una proteína de interés para su producción periplásmica en células de *E. coli* (R. M. Papi et al., 2005).

En primer lugar descargamos la secuencia nucleotídica de la AmyE desde la base de datos de GenBank. Después, utilizamos los dos oligonucleótidos reportados por Papi y sus colaboradores (R. M. Papi et al., 2005) que están modificados con extremos overhangs. Cada oligonucleótido está compuesto por un sitio de restricción en su extremo 3'-terminal que corresponden a NdeI y BamHI, respectivamente.

En la aplicación SnapGene, el archivo genético del AmyE fue abierto y sobre ésta se incorporaron los dos oligonucleótidos mencionados arriba, después se corrió un ensayo de PCR *in silico* para extraer el péptido señal N-AmyE de la amilasa. El producto *in silico* resultante corresponde a un tamaño 117 pb que está ordenado de la siguiente manera 5'-NdeI-(N-AmyE)-BamHI-3'.

En la misma aplicación, realizamos un ensayo *in silico* de restricción y ligación con el producto de PCR *in silico* y el vector de expresión "pET-30a(+).dna". Desde la aplicación, se abrió el archivo que contiene el vector de expresión pET-30a(+) y se cortó *in silico* por medio de las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Posteriormente, el producto de PCR compuesto con los extremos overhangs fue cortado también con el mismo conjunto de enzimas de restricción y procedimos a clonar creando un vector de expresión. El vector fue nombrado y guardado como "pET-30a(+)-N-AmyE.dna".

### 6.11.2. Diseño y construcción de pETNL

En el extremo del péptido señal N-AmyE se le acopló la secuencia nucleotídica de la LnqQ por técnicas de clonación molecular *in silico*. Inicialmente, el archivo genético del gen *lnqQ* fue descargado (GenBank no. AB235201.1) y abierto en la aplicación de SnapGene.

A la secuencia nucleotídica original de la *lnqQ*, en el extremo 5'-terminal, agregamos manualmente una secuencia que contiene el sitio de restricción BamHI y río debajo de ésta, agregamos un par de nucleótidos (TT). Inmediatamente después se colocó un codón de inicio (ATG) y se añadieron los 52 residuos restantes para un total de 53 de aminoácidos que representan a LnqQ. Justo en el extremo C-terminal de esta bacteriocina, se agregó una cola de polihistidina (H89-H94) y un codón de paro (TAG). En seguida se agregaron otro par de nucleótidos (TA) y se integró un sitio de restricción Sall. Esta sección correspondió a un fragmento lineal de 193 pb de la secuencia nucleotídica que codifica para LnqQ:6xHis (**Tabla 6**).

Desde SnapGene, realizamos un ensayo *in silico* de restricción y ligación entre el fragmento lineal de 193 pb con el vector de expresión “pET-30a(+):N-AmyE.dna”. Desde la aplicación, se abrió el archivo que contiene el vector de expresión y se cortó *in silico* por medio de las enzimas de restricción BamHI y Sall. Posteriormente, el fragmento lineal fue cortado también con el mismo conjunto de enzimas de restricción y procedimos a clonar creando un vector de expresión, nombrado y guardado como “pETNL.dna”.

El archivo genético del plásmido pETNL está guardando en formato .dna bajo el nombre “pETNL.dna”. En este plásmido se observan por los elementos genéticos propios de un vector pET30(a)+ en conjunto con los genes necesarios para la construcción N-AmyE:LnqQ.

**Tabla 6. Secuencia aminoacídica de N-AmyE:LnqQ**

Plásmido	Secuencia aminoacídica de N-AmyE:LnqQ (5'→3')	Tamaño
pETNL	<u>MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASRI</u> <b>L</b> <b>MAGFLKVVQL</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>G</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>W</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>D</b> <b>W</b> <b>L</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>D</b> <b>W</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>L</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>H</b> <b>H</b> HHHH	94

Los residuos subrayados representan el péptido señal. Los residuos en negritas representan a LnqQ.

### 6.11.3. Predicción de corte proteolítico de péptido señal N-AymE:LnqQ:6xHis

Los resultados obtenidos del corte proteolítico en el péptido señal N-AmyE fueron contrastados con los datos de seis secuencias aminoacídicas (**Tabla 7**) que tenían el reporte de que este mismo péptido señal N-AmyE era cortado de manera efectiva en cada una de ellas. Tres de las secuencias corresponden a las secuencias aminoacídicas totales de tres  $\alpha$ -amilasas reportadas en diferentes cepas de *B. subtilis* (Emori & Maruo, 1988; Kunst et al., 1997; Yang et al., 1983). Dos de éstas corresponden a secuencias que se utilizaron para investigar qué aminoácidos eran los necesarios para cortar el péptido señal N-AmyE en células de *B. subtilis* o de *E. coli* (Nakazawa et al., 1986; Sakakibara et al., 1993). La última corresponde a una construcción sintética donde el péptido señal N-AmyE fue utilizado para transportar liasa de pectina a la región periplásmica de *E. coli* (R. M. Papi et al., 2005).

**Tabla 7. Secuencias utilizadas para predicción de corte enzimático de N-AmyE:LnqQ**

Nombre	Secuencia aminoacídica
>Yang1983 (CAA23437.1)	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNWSFNTLKHNMKDIHDAGYTA IQTSPINQVKEGNQGDKSMNSWYWLQPTSYQIGNRYLGTEQEFKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNE VKSIPNWTGNTQIKNWSRDWDTQNSLLGLYDWTQNTQVQSYLKRFLDRALNDGADGFRFDAAKHIELPDDGSYG SQFWPNITNTSAEFQYGEILQDSASRDAAYANYMDVTASNYGHSIRSALKNRNLGVSINISHYASDVSADKLVTWVES HDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPKGSQIGDRGSALFEDQAITAVNRFHNV MAGQPEELSNPNGNNQIFMNQRGSHGVVLANAGSSSVSINTATKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSAV LYPDDIAKAPHVFLNYKTGVTHSFNDQLTITLRADANTTKAVYQINNGPDDRRLRMEINSQSEKEIQFGKTYTIML KGTNSDGVTRTEKYSFVKRDPASAKTIGYQNPNHWSQVNAYIYKHDGSRVIELTGSWPGKPMTKNADGIYTLTLPAD TDTTNAKVI FNNGSAQVPGQNQPGFDYVLNGLYND SGLSGSLPH
>Nakazawa1986 (PTUE33)	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFYLVLAGPAAASAQACPPETLVKVKDAEDQL
>Emori1988 (CAA30643.1)	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFYLVLAGPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNWSFNTLKHNMKDIHDAGYTA IQTSPINQVKEGNQGDKSMNSWYWLQPTSYQIGNRYLGTEQEFKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNE VKSIPNWTGNTQIKNWSRDWDTQNSLLGLYDWTQNTQVQSYLKRFLERALNDGADGFRFDAAKHIELPDDGSYG SQFWPNITNTSAEFQYGEILQDSASRDAAYANYMDVTASNYGHSIRSALKNRNLGVSINISHYASDVSADKLVTWVES HDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPKGSQIGDRGSALFEDQAITAVNRFHNV MAGQHEELSNPNGNNQIFMNQRGSHGVVLANAGSSSVSINTATKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSAV LYPDDIEIRCNTFFQ
>Sakakibara1993 (PTUBE695)	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFYLVLAGPAAASACAAPFNGTM
>Kunst1997 (NP_388186.2)	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNWSFNTLKHNMKDIHDAGYTA IQTSPINQVKEGNQGDKSMNSWYWLQPTSYQIGNRYLGTEQEFKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNE VKSIPNWTGNTQIKNWSRDWDTQNSLLGLYDWTQNTQVQSYLKRFLDRALNDGADGFRFDAAKHIELPDDGSYG SQFWPNITNTSAEFQYGEILQDSASRDAAYANYMDVTASNYGHSIRSALKNRNLGVSINISHYASDVSADKLVTWVES HDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPKGSQIGDRGSALFEDQAITAVNRFHNV MAGQPEELSNPNGNNQIFMNQRGSHGVVLANAGSSSVSINTATKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSAV LYPDDIAKAPHVFLNYKTGVTHSFNDQLTITLRADANTTKAVYQINNGPETAFKDGQDTIGKGDPPFGKTYTIMLK GTNSDGVTRTEKYSFVKRDPASAKTIGYQNPNHWSQVNAYIYKHDGSRVIELTGSWPGKPMTKNADGIYTLTLPADT DTTNAKVI FNNGSAQVPGQNQPGFDYVLNGLYND SGLSGSLPH
>Papi2005	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASRIRMSYPESKLTGLTGFAAAKVTGGWAGPVVSITNLDQLKANIG TVTPQVLVINSNISASSLTKVNMGANKTLIGSFQNRITLENIHRLATAQSQNIILQNLIFKHSANIKANDDIQVYLN GSKYWIHCSFVGHSWSTTDGSEDKLLYIGEKADYATISNCFGSHKYGLIFGHPADDNNAFNGYPRLTLCNHRFD NMEVRAPGLMRYGYFHVYNNYINKFHLGFTLAQNANILSESNYFGEQSQNNGMLDDKSGTFTDTNSVPPITNQKSP KAQWTATSNYAYTLKTAQAQAKDFTQKNAGAQAALVFGS
>pETNL	MFAKRFKTSLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASRILMAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIDWV VSKIKQILGIKHHHHHH



En las bacterias, existen dos mecanismos generales para la secreción de proteínas a través de la membrana citoplasmática. En la vía de Secreción General, denominada como vía Sec, las proteínas son translocadas a la membrana en su forma desnaturalizada y posteriormente son plegados en forma nativa en el lado transversal de la membrana. Mientras tanto, en la vía de Translocación de Gemelos Argininas conocida como vía Tat, las proteínas son translocadas en su estado plegado nativo (Natale, Brüser, & Driessen, 2008).

De acuerdo con nuestros resultados (**Tabla 8**) el valor de calculado de predicción de corte de péptido señal de las secuencias aminoacídicas completas de tres  $\alpha$ -amilasas representan 0.9724 (Yang et al., 1983), 0.9458 (Emori & Maruo, 1988) y 0.9724 (Kunst et al., 1997), respectivamente. De las secuencias parciales de péptidos señales N-AmyE los resultados indican 0.8722 (Nakazawa et al., 1986) y 0.6092 (Sakakibara et al., 1993). Para la secuencia que se utilizó para exportar la liasa de pectina al periplasma de *E. coli*, el valor calculado correspondió a 0.8262 (R. M. Papi et al., 2005) en todas estas secuencias el mecanismo de secreción general de proteínas es el tipo Sec clase I. Para nuestra proteína N-AmyE:LnqQ, el valor calculado estimado fue de 0.4063 sin que fuera determinado su mecanismo de corte predictivo. Es decir, nuestro valor calculado es mucho menor a lo observado contra secuencias que habían sido probados experimentalmente.

**Tabla 8. Predicción de corte enzimático de péptido señal N-AmyE**

Identificación	Predicción	Sec/SPI	Tat/SPI	Sec/SPII	Otro	Pos
>Yang1983	SP(Sec/SPI)	0.9724	0.0104	0.0079	0.0092	33 y 34
>Nakazawa1986	SP(Sec/SPI)	0.8722	0.0359	0.0229	0.069	33 y 34
>Emori1988	SP(Sec/SPI)	0.9458	0.0122	0.009	0.033	33 y 34
>Sakakibara1993	SP(Sec/SPI)	0.6092	0.0428	0.1377	0.2103	31 y 32
>Kunst1997	SP(Sec/SPI)	0.9724	0.0104	0.0079	0.0092	33 y 34
>Papi2005	SP(Sec/SPI)	0.8262	0.0183	0.0178	0.1377	31 y 32
>pETNL	Otro	0.4063	0.0249	0.0134	0.5554	Otro

*Sec/SPI: Translocón Sec mediado por Peptidasa de Señal I (Lep). Tat/SPI: Translocón Tat mediado por Peptidasa de Señal I (Lep). Sec/SPII: Translocón Sec mediado por Peptidasa de Señal II (Lsp). Pos: Sitio de corte enzimático dentro de la estructura aminoacídica lineal.*

## **6.12. Diseño y análisis *in silico* del pSmbP-LnqQ**

### **6.12.1. Recuperación bioinformática del péptido de fusión SmbP**

El archivo genético del péptido de fusión SmbP está guardado en formato .dna bajo el nombre “pET30a-SmbP.dna” y está flanqueado en el extremo 5'-terminal por el sitio de restricción NdeI y en el extremo 3'-terminal por el sitio de restricción NcoI. El péptido de fusión está dividido en dos secciones, en el extremo N-terminal está compuesta por la región citoplasmática de la SmbP (SmbP) compuesta por 94 residuos, seguido de dos residuos G95 y T96; río abajo inicia el extremo C-terminal que está compuesta por cinco residuos y representa al sitio de corte por enteroquinasa (DDDDK).

### **6.12.2. Diseño y construcción de pSmbP-LnqQ**

El archivo genético que contiene la bacteriocina LnqQ fue descargado de la base de datos (GenBank no. AB235201.1). Inmediatamente en el extremo C-terminal del péptido de fusión, mediante la aplicación SnapGene, añadimos manualmente un residuo de alanina en la posición 102 y río debajo de ésta, añadimos los 53 residuos que conforman el LnqQ iniciando con M103. En dirección al extremo C-terminal, inmediatamente después del codón de término (TAA), se agregó el sitio de restricción XhoI. Los elementos que componen la construcción del pSmbP-LnqQ (**Tabla 9**) están representados en el siguiente orden 5'-NdeI-SmbP-DDDDK-LnqQ-XhoI-3'.

El archivo genético del plásmido pSmbP-LnqQ está guardado en formato .dna bajo el nombre “pSmbP-LnqQ GFJBC01.dna”. En este plásmido se observan por los elementos genéticos propios de un vector pET30(a)+.

**Tabla 9. Secuencia aminoacídica de SmbP-LnqQ**

Plásmido	Secuencia aminoacídica del producto del vector de expresión (5'→3')	Tamaño
pSmbP-LnqQ	<u>MSGHTAHVDEAVKHAEAEVAHKGEGHTDQ</u> <u>LEHAKESLTHAKAAS</u> <u>EAGGNTHVGHGIKHLEDAIKHGEEGHVGVATKHAQEAIEHLRASE</u> <u>HKSHGT</u> <b>DDDDK</b> <b>MAGFLKVVQ</b> <b>LLAKYGS</b> <b>KAVQWAWANKG</b> <b>KILDWL</b> <b>NAGQAIDWV</b> <b>SKIKQILGIK</b>	155

*Los residuos subrayados representan el péptido de fusión. Los residuos resaltados representan el sitio de corte de enteroquinasa. Los residuos en negritas representan a LnqQ.*

### 6.12.3. Predicción de corte proteolítico de péptido de fusión SmbP-LnqQ

De acuerdo con los resultados de la aplicación de PeptideCutter, se detectó un único sitio de corte en la proteína SmbP-LnqQ para la enzima enteroquinasa que se encuentra ubicado en el residuo K101, lo cual coincide con lo esperado.

### 6.13. Identificación de codones de paro en los diseños

Los resultados sobre la identificación de codones de paro post diseño en la construcción de pETNL y pSmbP-LnqQ, indicaron que no existe evidencia de codones de paro, ya que la aplicación en línea logró identificar un marco de lectura abierto con un tamaño de 285 pb que codifican para 94 aminoácidos, cuya secuencia coincide con exactitud con la secuencia aminoacídica de N-AmyE:LnqQ para el caso de pETNL. Mientras tanto, un marco de lectura compuesto por un tamaño molecular de 488 pb que se traducen para 155 aminoácidos y cuya secuencia coincide en su totalidad con la secuencia aminoacídica de SmbP-LnqQ.

### 6.14. Predicción de peso molecular de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ

De acuerdo con los resultados calculados por la aplicación de Compute pI/Mw tool de ExPasy, el peso molecular teórico estimado del producto N-AmyE:LnqQ de pETNL es de 10,534.68 Da con un punto isoeléctrico pi = 10.63 mientras que para

el producto SmbP-LnqQ de pSmbP-LnqQ, el peso estimado es de 16,697.71 Da con punto isoelectrico  $pI = 6.45$ .

### 6.15. Predicción de solubilidad y localización celular N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ

Según los resultados, los índices de solubilización (**Tabla 10**) de N-AmyE:LnqQ y del SmbP-LnqQ es de 0.575 y 0.865, respectivamente. La aplicación, sin embargo, clasifica a los productos del vector pETNL como inválidos mientras que los productos de pSmbP-LnqQ fueron considerados como solubles. La razón porque la N-AmyE:LnqQ es considerado como inválido se debe a que fue identificado como proteína de membrana. En el caso de localización celular (**Tabla 11**) los pronósticos indican que los productos producidos por pETNL y pSmbP-LnqQ se encontrarán en membrana plasmática y en el citoplasma, respectivamente.

**Tabla 10. Predicción de solubilidad N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ**

Producto	Índice	Solubilidad
N-AmyE:LnqQ	0.575	Inválido
SmbP-LnqQ	0.865	Soluble

*De acuerdo con la aplicación Protein-Sol reporta que cualquier valor de solubilidad con superior a 0.45 es considerado soluble. Los datos que fueron considerados como inválidos con un índice de solubilidad superior a 0.45 es porque son considerados proteínas de membrana y son inválidos para esta herramienta.*

**Tabla 11. Predicción de localización celular N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ**

Producto	Valor	Localización subcelular
N-AmyE:LnqQ	0.85	Membrana plasmática
SmbP-LnqQ	0.7	Citoplasma

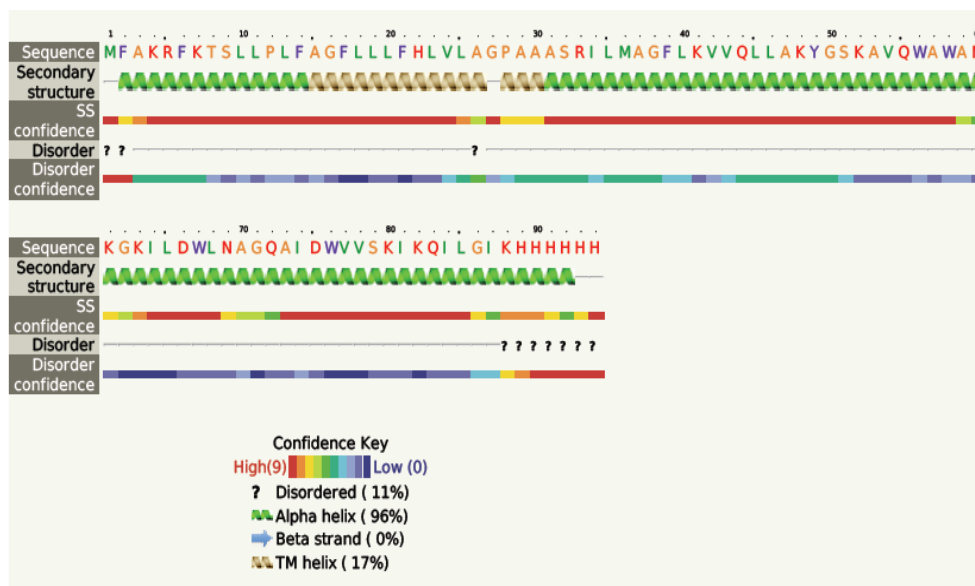
Esto coincide con lo observado en los antecedentes, ya que indican que las proteínas expresadas en *E. coli* con el péptido señal N-AmyE en su región N-terminal a menudo se localizan en el periplasma (Nakazawa et al., 1986; R. M. Papi et al., 2005). Mientras que las proteínas acopladas con el péptido de fusión

SmbP son reportadas para encontrarse en la región citoplasmática debido a que la sección aminoacídica que las orienta al periplasma fue removida de la secuencia original de residuos, quedándose por tanto en el citoplasma celular de *E. coli* (Vargas-Cortez et al., 2016).

#### **6.16. Predicción de estructura secundaria y tridimensional de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ**

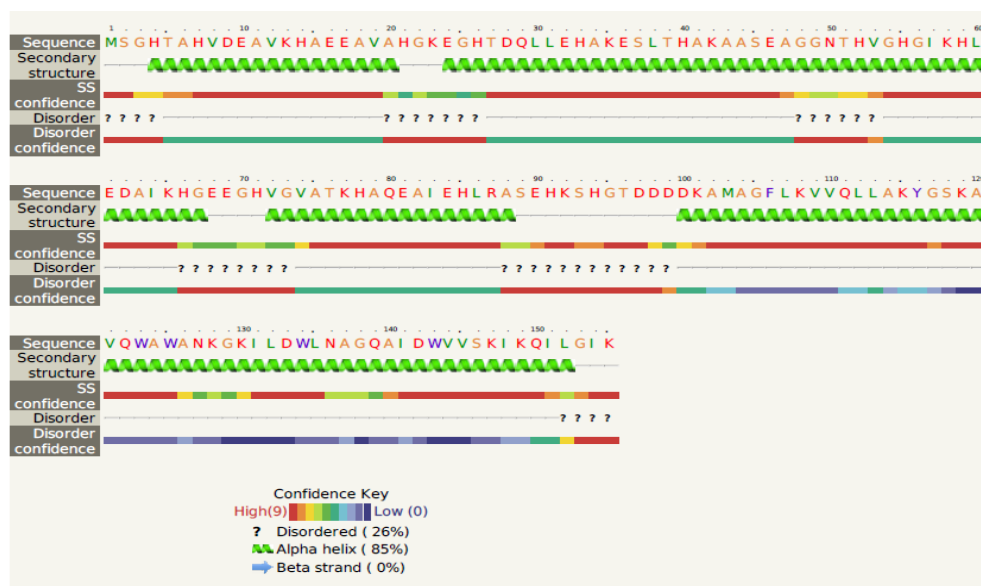
El modelo estructural tanto en su forma secundaria (**Figura 6**) como tridimensional (**Figura 8**) para N-AmyE:LnqQ así como la presunta estructura secundaria (**Figura 7**) y tridimensional (**Figura 10**) para SmbP-LnqQ fueron revelados en este documento. En la estructura secundaria prevista para N-AmyE:LnqQ se espera que el 96% de la secuencia esté compuesta por estructuras tipo  $\alpha$ -hélices y se estima que el 17% de la secuencia aminoacídica total estén embebidas en la región transmembranal. La evidencia predictiva de la N-AmyE:LnqQ (**Figura 9**) a través de la aplicación Phyre2, indicó que los primeros 12 residuos del extremo N-terminal estarían orientados en la región extracelular, mientras que los residuos 15 al 30 estarían ubicados en región intermembranal entre el espacio extracelular y la citoplasmática. El resto de los residuos del extremo C-terminal estarían orientados en la cara citoplasmática de la célula de *E. coli*. Mientras tanto, la estructura secundaria putativa para SmbP-LnqQ indica que el 85% de secuencia total está compuesta por  $\alpha$ -hélices.

En las estructuras tridimensionales putativas tanto para N-AmyE:LnqQ como en la SmbP-LnqQ prevalece la formación de cuatro  $\alpha$ -hélices. Estos motivos estructurales tipo  $\alpha$ -hélices son comúnmente observados en bacteriocinas similares a LnqQ (Lynch et al., 2019), de manera que podemos predecir que la estructura secundaria y tridimensional de la LnqQ no se ve afectada cuando están acopladas tanto por N-AmyE como con SmbP.



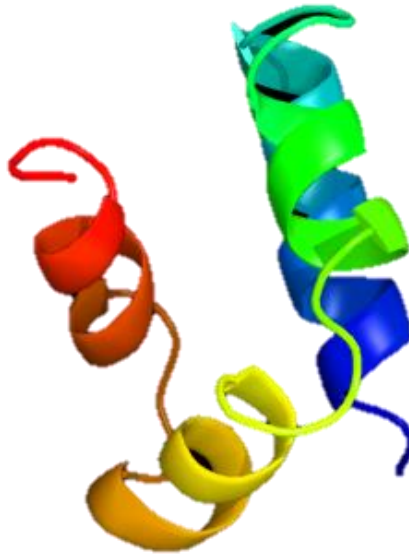
**Figura 6. Predicción de la estructura secundaria de N-AmyE:LnqQ**

*La estructura secundaria predicha del N-AmyE:LnqQ en Phyre2.*



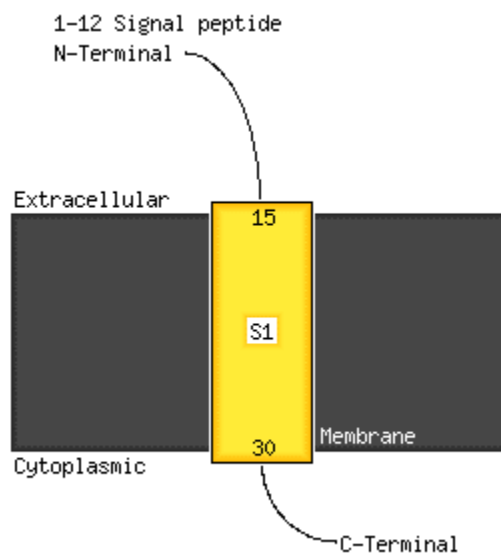
**Figura 7. Predicción de la estructura secundaria de SmbP-LnqQ**

*La estructura secundaria putativa del SmbP-LnqQ en Phyre2.*



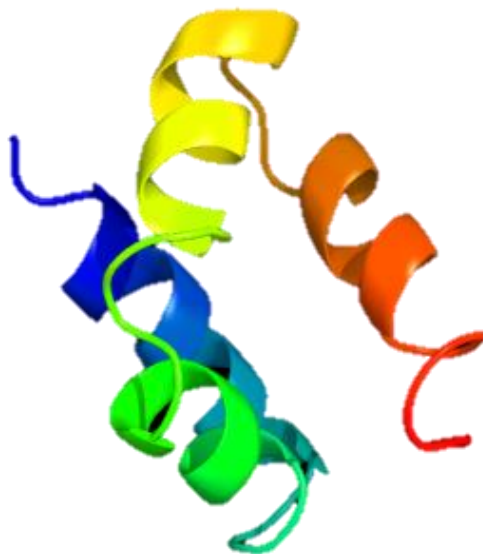
**Figura 8. Predicción de estructura tridimensional de N-AmyE:LnqQ**

*La imagen fue elaborada en el programa Phyre2 y representa la estructura tridimensional putativa de N-AmyE:LnqQ. La imagen está coloreada con los colores del arcoíris de N- al C-terminal. Las dimensiones propuestas por modelo son de (Å): X:29.824 Y:24.988 Z:25.496.*



**Figura 9. Predicción de hélices transmembranales para N-AmyE:LnqQ**

*La imagen es resultado de la predicción propuesta por Phyre2 para hélices transmembranales de N-AmyE:LnqQ.*



**Figura 10. Predicción de estructura tridimensional de SmbP-LnqQ**

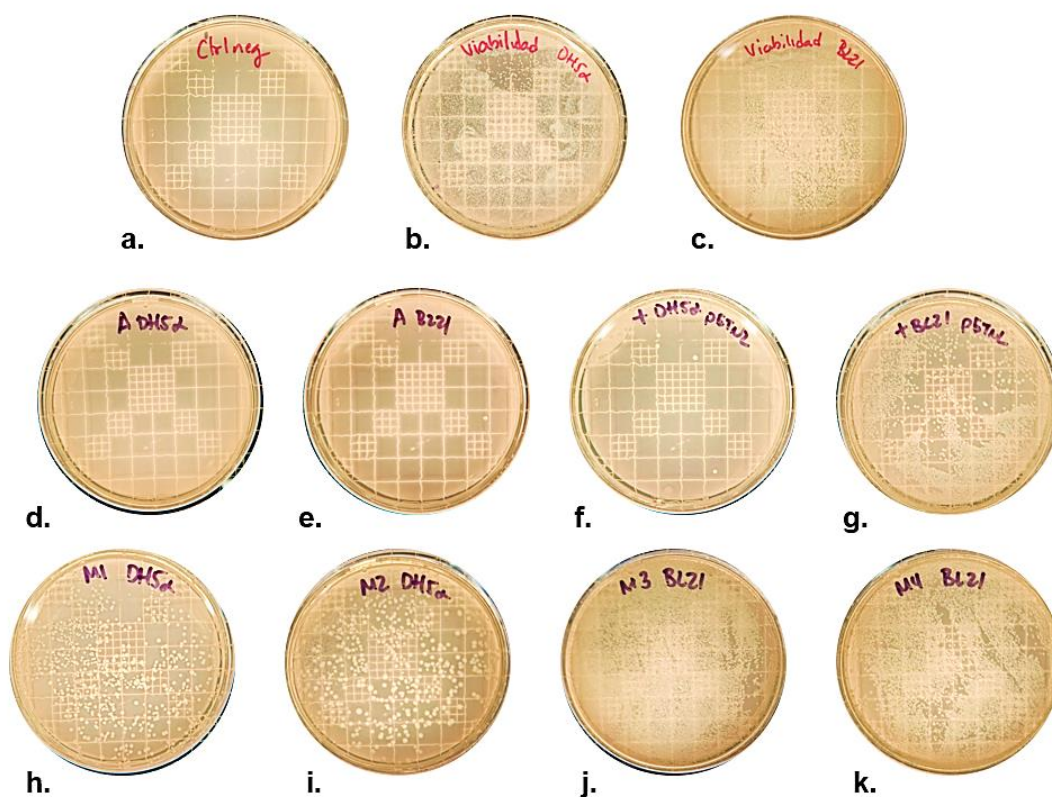
*La imagen fue elaborada en el programa Phyre2 y representa la estructura tridimensional putativa de SmbP-LnqQ. La imagen está coloreada con los colores del arcoíris de N- al C-terminal. Las dimensiones propuestas por modelo son de (Å): X:32.655 Y:24.988 Z:25.496.*

## **6.17. Transformación de células de *E. coli* con pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ**

### **6.17.1. Transformación de células de *E. coli* con DNA exógeno**

Las células presuntamente transformadas fueron seleccionadas con kanamicina. De acuerdo con la evidencia presentada (**Figura 11**), los controles experimentales cumplieron con su objetivo ya que no se registró crecimiento en placas de LB agar estériles en el control negativo (**Figura 11 a**), en cuanto al control de viabilidad éste demostró que la electroporación no fue un factor significativo que causara la muerte de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  como BL21 (DE3) (**Figura 11 b, c**). Por último, los controles con antibiótico demostraron que la kanamicina (50  $\mu$ g/ml) era lo suficientemente potente para seleccionar células (**Figura 11 d, e**). Por último, demostramos bajo la técnica de electroporación que las cepas de células de *E. coli* tanto BL21 (DE3) como DH5 $\alpha$  fueron correctamente transformadas con los vectores de expresión pETNL (**Figura 11 f, g**), pET30(a)+ (**Figura 11 h, j**) y pSmbP-LnqQ (**Figura 11 i, k**). Los ensayos fueron realizados por triplicado.





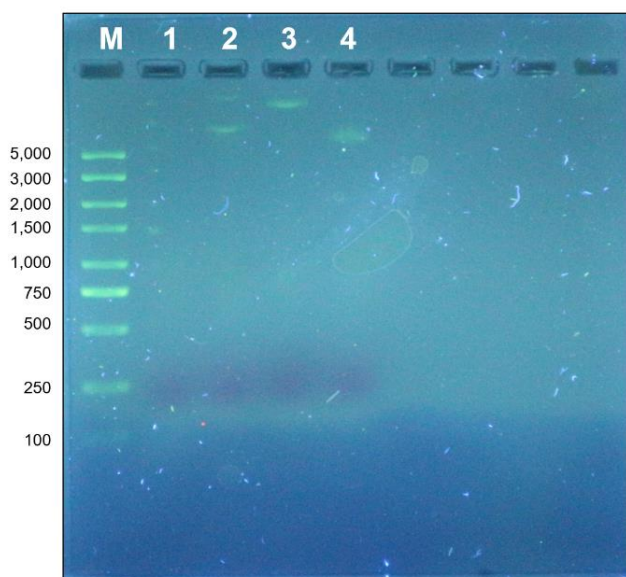
**Figura 11. Transformación de *E. coli* DH5α y BL21 (DE3) con pET30a(+), pETNL y pSmbP-LnqQ.**

Rótulo	Descripción
a.	Control negativo
b.	Control viabilidad DH5α
c.	Control viabilidad BL21 (DE3)
d.	Control kanamicina + DH5α
e.	Control kanamicina + BL21 (DE3)
f.	DH5α + pETNL
g.	BL21 (DE3) + pETNL
h.	DH5α + pET30a(+)
i.	DH5α + pSmbP-LnqQ.
j.	BL21 (DE3) + pET30a(+)
k.	BL21 (DE3) + pSmbP-LnqQ.

*Las placas rotuladas del a-c son placas LB con agar mientras que las placas d-k son placas LB con agar suplementadas con kanamicina (50 µg/ml, concentración final).*

### 6.17.2. Extracción y purificación de DNA exógeno de células de *E. coli*

Los ensayos para la extracción y purificación de los plásmidos pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ de células de *E. coli* que fueron observados en un gel de agarosa 1% (p/v). Según la evidencia (**Figura 12**), nuestros controles demuestran que tanto el plásmido pETNL como el vector pSmbP-LnqQ se encontraban presentes. Los índices de concentración y calidad de cada uno de los vectores fueron para pET30(a)+ de 9.11 ng/μl con  $A_{260}/A_{280}$  en 1.95, para el vector pETNL de 5.32 ng/μl con  $A_{260}/A_{280}$  en 1.94 y para el vector pSmbP-LnqQ de 28.61 ng/μl con  $A_{260}/A_{280}$  en 1.88. Según la literatura, los índices para considerar a un DNA plasmídico como puro deben tener valores espectrofotométricos de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8-2.0 donde un valor menor a 1.8 se considera como contaminación con proteínas y un valor de superior a 2.0 se considera contaminación por RNA (Koetsier, Cantor, & Biolabs, s/f). Podemos inferir que los vectores de expresión pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ fueron recuperados en buena cantidad con un buen índice de pureza.



*Gel de agarosa 1% (p/v) adicionado con Eco-Stain corrido durante 1 h a 120 V en buffer TBE 1 X*

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (pb)
1	Control negativo
2	Plásmido pETNL
3	Plásmido pSmbP-LnqQ
4	Plásmido pSmbP-LnqQ

*Los plásmidos fueron extraídos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pETNL o pSmbP-LnqQ.*

*El marcador de peso molecular corresponde a 100-5000bp DNA Marker Plus, Ready to Use (Cat. No. SGM03, BioBasic, Canadá).*

**Figura 12. Gel de agarosa con plásmidos pETNL y pSmbP-LnqQ**

### **6.17.3. Oligonucleótidos para identificación de plásmidos por PCR punto final**

Según los resultados obtenidos por OligoAnalyzer Tool, tras ajustar las condiciones de los oligonucleótidos a las especificaciones del fabricante del kit de la polimerasa, el tamaño molecular del oligonucleótido T7 promoter primer es de 20 pb con un contenido GC a 40% y un valor  $T_m = 59.1^\circ\text{C}$  con un hairpin de -0.36 kcal/mol a una  $T_m$  de  $31.6^\circ\text{C}$  y un valor homodímero de -4.16 kcal/mol. Mientras tanto, el tamaño molecular del oligonucleótido T7 terminal primer es de 19 pb con un contenido GC a 52.6% y un valor  $T_m = 61^\circ\text{C}$  con un hairpin de 0.02 kcal/mol a una  $T_m$  de  $24.8^\circ\text{C}$  y un valor homodímero de -4.74 kcal/mol. El valor heterodímero entre ambos oligonucleótidos es de -4.38 kcal/mol.

De acuerdo con los resultados de la aplicación NetPrimer, el oligonucleótido T7 promoter primer tiene un rating de éxito en 86.0 y presenta un valor de estabilidad en su extremo 3'-terminal de -8.7 kcal/mol y no se identificó al hairpin, el valor homodímero se registró en -7.59 kcal/mol. En el caso del oligonucleótido T7 terminal primer, este presenta un rating de éxito en 87.0 con un valor de estabilidad en su extremo 3'-terminal de -11.42 kcal/mol y tampoco se identificaron hairpins, el valor homodímero se registró en -5.74 kcal/mol. El valor heterodímero entre ambos oligonucleótidos es de -4.38 kcal/mol.

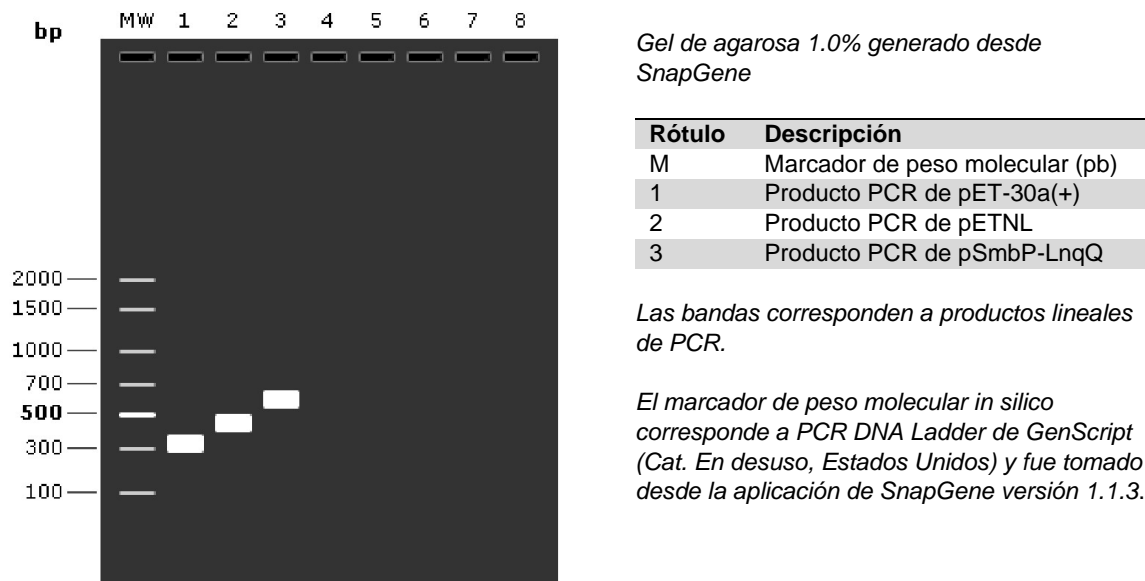
De acuerdo con los criterios habituales para selección de oligonucleótidos, ambos se mantuvieron en los estándares ya que presentaron un tamaño entre 18 a 25 pb con un hairpin cuyo valor de  $T_m$  fue menor a la  $T_m$  reportado para el oligonucleótido y los valores tanto de los homodímeros y heterodímeros nunca fueron más negativo o iguales a -9 kcal/mol.

En cuanto al cálculo de la  $T_a$  para ambos oligonucleótidos, utilizamos la regla general de sustraer  $5^\circ\text{C}$  al  $T_m$  calculado para en ambos oligonucleótidos. Para el cálculo de la  $T_a$  óptimo para un par de oligonucleótidos para un blanco en particular se utilizó la siguiente fórmula matemática:  $T_{aOpt} = 0.3 \times (T_m \text{ de oligo}) + 0.7 \times (T_m \text{ producto}) - 14.9$ ; donde el valor de  $T_m$  del oligonucleótido es la temperatura de fusión del oligonucleótido menos estable y la  $T_m$  es el valor del

temperatura de fusión del producto de PCR (Rychlik, Spencer, & Rhoads, 1990). De esta manera, promediamos el valor de la  $T_m$  de ambos oligonucleótidos y el resultado fue 60°C. A este valor le sustrajimos 5°C para un  $T_a$  ajustado en 55°C en los ensayos de PCR punto final para la identificación de los plásmidos.

Por último, calculamos el total de ciclos y el tiempo de extensión para los ensayos de PCR punto final. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se debe agregar 1 minuto por cada kb por sintetizar en los ensayos. De esta manera, calculamos en primera instancia el tamaño molecular de los productos de los ensayos de PCR de los vectores de expresión pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ para determinar el tiempo de extensión. Para lograr este objetivo, realizamos una reacción *in silico* de PCR punto final entre los dos oligonucleótidos T7 con cada uno de los vectores de expresión utilizados.

Los archivos genéticos de los tres vectores de expresión fueron abiertos desde la aplicación de SnapGene y ejecutamos una PCR punto final *in silico*. Posteriormente, corrimos una simulación de gel de agarosa al 1%. De acuerdo con los resultados de nuestra simulación (**Figura 13**), las bandas esperadas de los productos lineales de PCR de los vectores de pET30(a)+, pETNL y pSmbP-LnqQ se encontrarían entre 367 pb, 488 pb y 651 pb, respectivamente. Con esto confirmamos que ninguno de los productos de PCR esperados tendría un tamaño superior al 1 kb y procedimos a configurar la reacción para el ensayo de PCR punto final.

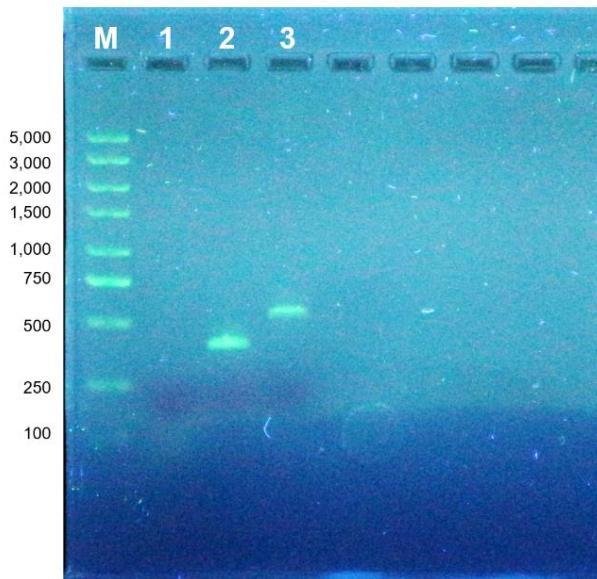


**Figura 13. Simulación de PCR para vectores de expresión**

Así pues configuramos las condiciones de corrida en el termociclador las cuales fueron registradas de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 94°C por 180 s, después 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión con temperaturas en 94°C, 55°C y 72°C respectivamente y sus respectivos tiempos de reacción a 30 s, 45 s y 30 s. Finalmente, se agregó una etapa de extensión final con una temperatura a 72°C por 420 s.

#### 6.17.4. Corrida de DNA en gel de agarosa

Después de realizar la técnica de PCR punto final y una posterior corrida en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, observamos una banda con tamaño de 367 pb para el producto de PCR obtenida del vector pET30(a)+, al tiempo que recolectamos una banda de 488 pb para el producto de PCR del vector pETNL (**Figura 14**) y finalmente, encontramos una banda de 651 pb para el producto de PCR del vector pSmbP-LnqQ (**Figura 15**). Dado que los valores predichos en la simulación coinciden con los observado experimentalmente, confirmamos que nuestras cepas de *E. coli* estaban efectivamente transformadas con su respectivo vector de expresión.



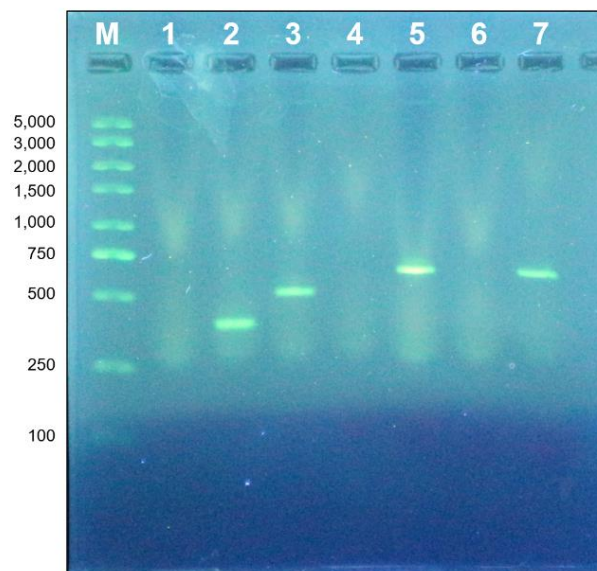
**Figura 14. PCR de pETNL**

Gel de agarosa 1% (p/v) adicionado con Eco-Stain corrido durante 1 h a 120 V en buffer TBE 1 X

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (pb)
1	Control negativo
2	PCR de pET30(a) virgen
3	PCR de pETNL

Los plásmidos fueron extraídos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pETNL o pET30(a).

El marcador de peso molecular corresponde a 100-5000bp DNA Marker Plus, Ready to Use (Cat. No. SGM03, BioBasic, Canadá).



**Figura 15. PCR de pSmbP-LnqQ**

Gel de agarosa 1% (p/v) adicionado con Eco-Stain corrido durante 1 h a 120 V en buffer TBE 1 X

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (pb)
1	Control negativo
2	Control positivo pET30(a) vacío
3	Control positivo pETNL
4	Control negativo PCR pUC57-DPQ
5	Muestra PCR pSmbP-LnqQ
6	Control negativo PCR pUC57-DPQ
7	Muestra PCR pSmbP-LnqQ

Los plásmidos fueron extraídos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pETNL o pET30(a).

El marcador de peso molecular corresponde a 100-5000bp DNA Marker Plus, Ready to Use (Cat. No. SGM03, BioBasic, Canadá).

## 6.18. Determinación de expresión proteica por SDS-PAGE

Para los análisis de expresión de proteínas, utilizamos algunos vectores de expresión que han sido exitosos en la producción de proteínas. Los vectores pET30a-SmbP\_LL-37 y pET30a-SmbP\_MP1106 fueron amablemente compartidos por David Antonio Pérez, miembro del grupo de investigación PEP con sede en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la UANL



(Monterrey, Nuevo León). Similarmente, el vector pET30NP-Hoc fue compartido por Francisco de Jesús Balderas Cisneros, miembro del grupo de investigación NBR con sede en el CIBYN (Apodaca, Nuevo León).

Dado que la información de los tres plásmidos se encuentra o se encontraba en estado de revisión al momento de redactar este documento por sus respectivos comités de revisión, solo podemos limitarnos a mencionar los pesos moleculares de los productos de cada vector de expresión. Para los dos vectores de David Pérez (D. Pérez, comunicación personal, 2021), el peso molecular estimado de ambos productos es 15 kDa mientras que el vector de Francisco Balderas, el peso molecular de su producto es de 95 kDa (F. Balderas, comunicación personal, 2021).

#### **6.18.1. Inducción de IPTG en células de *E. coli* modificadas**

Para la inducción por IPTG, seguimos los protocolos preestablecidos para la inducción de proteínas heterólogas en células de *E. coli*. En nuestro ensayo, la concentración de IPTG elegida para la inducción de N-AmyE:LnqQ y SmbP-LnqQ correspondió a 0.1 mM. Nosotros utilizamos esta concentración debido a que los reportes indican que esta concentración es lo suficiente para saturar la reacción biológica, evitando la toxicidad celular por este compuesto (Malakar & Venkatesh, 2012). Los valores típicos de IPTG más utilizados para la inducción usualmente se encuentran entre 0.5 mM y 1.0 mM (Mesa-Pereira et al., 2018).

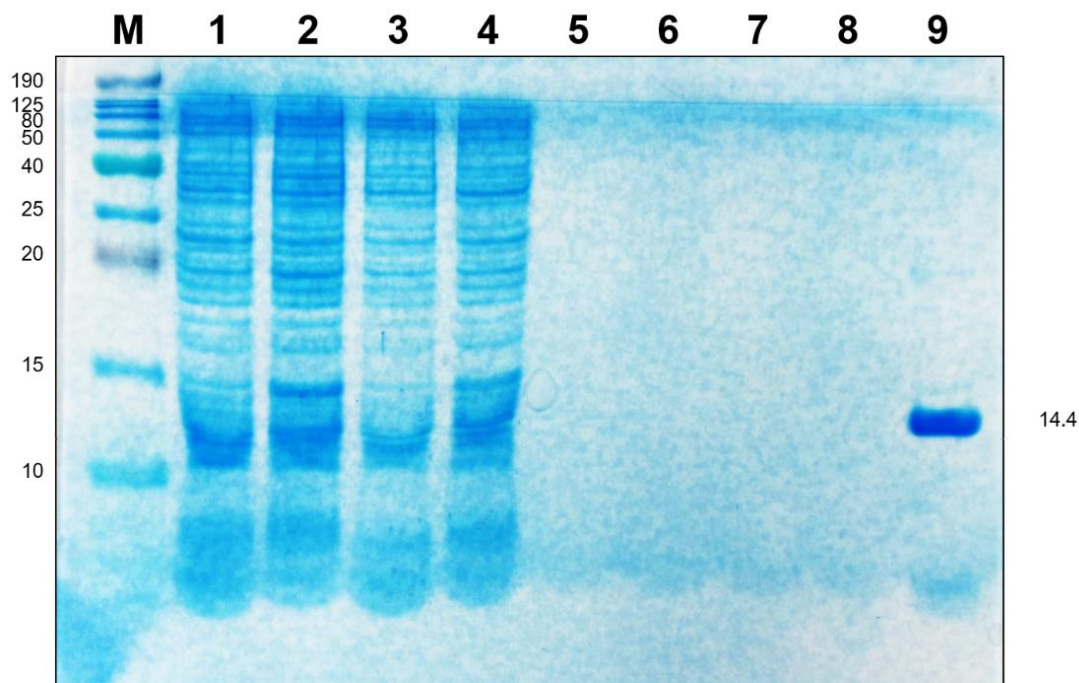
En nuestros cultivos, el IPTG fue añadido en la fase exponencial tardía ( $OD_{600} = 0.4-0.6$ ) dado que el costo energético es más alto durante la fase exponencial temprana que en la tardía (Malakar & Venkatesh, 2012). Además, se presume que en esta fase, el total de proteínas producidas pueden alcanzar rendimientos productivos superiores a 350% (Larentis et al., 2014). Para nuestros ensayos, utilizamos dos temperaturas para inducir, 37°C y 25°C y la razón de utilizar una temperatura más baja es porque es un método habitual para incrementar la solubilidad de proteínas recombinantes en *E. coli* (Schein, 1989).

### 6.18.2. SDS-PAGE de proteínas periplásmicas de *E. coli* modificadas con pETNL

Nuestros estudios preliminares bioinformáticos indicaban que la proteína N-AmyE:LnqQ sería insoluble (**Tabla 10**) y que tanto por sus antecedentes (Nakazawa et al., 1986; R. M. Papi et al., 2005; Sjöström et al., 1987) por sus características moleculares, estaría presuntamente ubicada en la región periplásmica de *E. coli* (**Tabla 11**). Sin embargo, nuestros resultados por ensayos de SDS-PAGE, indicaron que la inducción por IPTG en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el vector pETNL para la producción de N-AmyE:LnqQ tanto en la fracción soluble como insoluble de proteínas a una temperatura de inducción 25°C (**Figura 16**) como a 37°C (**Figura 17**) en la fracción periplásmica no fue posible en células de *E. coli* BL21 (DE3), esta manifestación fue reportado en múltiples ocasiones. De acuerdo con nuestros resultados, no logramos determinar la presencia de bandas de proteínas en la región esperada, que según los análisis predictivos, la proteína N-AmyE:LnqQ debía tener un peso molecular cercano a 10.5 kDa.

Es de mencionar que el valor de predicción de corte de péptido señal de la proteína N-AmyE:LnqQ fue muy inferior a los valores de predicción observados en secuencias que contienen el péptido señal N-AmyE y que habían sido previamente validados experimentalmente (**Tabla 8**). Otro aspecto para considerar es que los residuos reconocidos para el corte enzimático difieren entre los diferentes tipos de bacterias (Nakazawa et al., 1986). Esto quedó demostrado cuando observamos que los residuos utilizados para el corte de este péptido señal podían diferir inclusive en el mismo tipo de bacteria. Por ejemplo, en la secuencia total de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa reportada por Yang y otros (Yang et al., 1983), Emori y otros (Emori & Maruo, 1988) y Kunst y otros (Kunst et al., 1997) los residuos observados corresponden al 33 y 34 mientras que para las secuencias de aminoácidos a los que se les fue acoplado el péptido señal en su región N-terminal como las reportadas por Sakakibara y otros (Sakakibara et al., 1993) y Papi y otros (R. M. Papi et al., 2005) los residuos de corte se ubicaron en la posición 31 y 32.

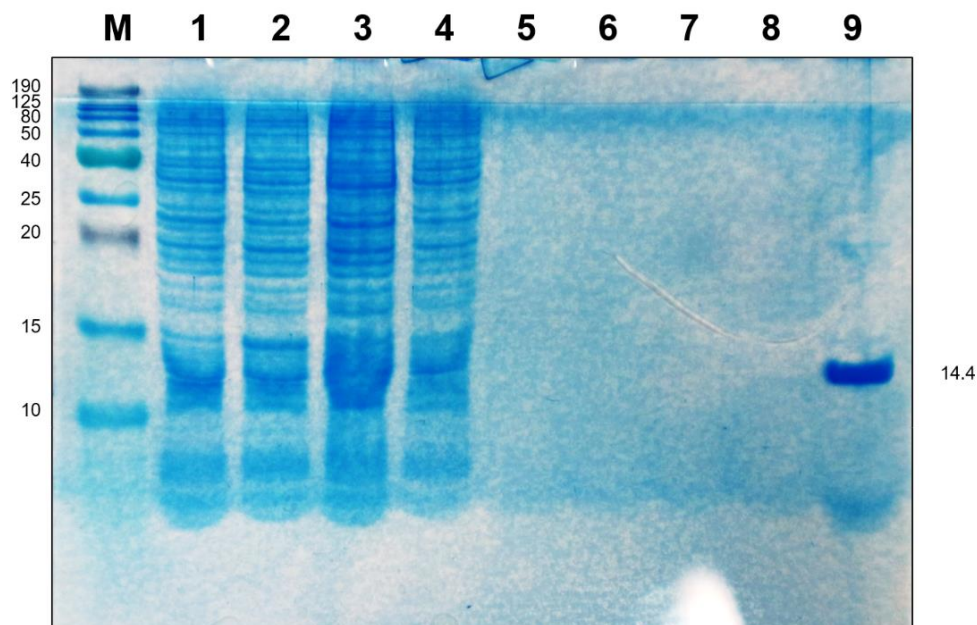




**Figura 16. Gel de *E. coli* BL21 (DE3) con pETNL inducido a 25°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido ni IPTG. Fracción soluble.
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido + IPTG 0.1 mM a 25°C. Fracción soluble.
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL sin IPTG a 25°C. Fracción soluble.
4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM a 25°C. Fracción soluble.
5	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido ni IPTG. Fracción insoluble.
6	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido + IPTG 0.1 mM a 25°C. Fracción insoluble.
7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL sin IPTG a 25°C. Fracción insoluble.
8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM a 25°C. Fracción insoluble.
9	Lisozima (14.4 kDa)

Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las bandas son las fracciones solubles e insolubles que fueron extraídas de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pETNL. El marcador de peso molecular corresponde a HyperPAGE Prestained Protein Marker (10 kDa to 190 kDa) (Cat. No. BIO-33066, Meridian Life Science Inc, Estados Unidos).



**Figura 17. Gel de *E. coli* BL21 (DE3) pETNL inducido a 37°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido ni IPTG. Fracción soluble.
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido + IPTG 0.1 mM a 37°C. Fracción soluble.
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL sin IPTG a 37°C. Fracción soluble.
4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM a 37°C. Fracción soluble.
5	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido ni IPTG. Fracción insoluble.
6	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin plásmido + IPTG 0.1 mM a 37°C. Fracción insoluble.
7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL sin IPTG a 37°C. Fracción insoluble.
8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM a 37°C. Fracción insoluble.
9	Lisozima (14.4 kDa)

Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las bandas son las fracciones solubles e insolubles que fueron extraídas de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pETNL. El marcador de peso molecular corresponde a HyperPAGE Prestained Protein Marker (10 kDa to 190 kDa) (Cat. No. BIO-33066, Meridian Life Science Inc, Estados Unidos).

### 6.18.3. SDS-PAGE de proteínas citoplásmicas de *E. coli* modificadas con pSmbP-LnqQ

Los estudios preliminares predictivos para la producción heteróloga de SmbP-LnqQ en *E. coli* indicaban que la presencia del péptido de fusión SmbP aumentaría la solubilidad de la proteína recombinante solubilidad (**Tabla 10**) y que además, sería localizado en el citoplasma celular (**Tabla 11**) con un peso molecular aproximado de 16.7 kDa. Nuestros resultados por ensayos de SDS-PAGE indicaron que no hubo producción citoplasmática de una banda esperada de 15 kDa tras inducir con IPTG a células de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el vector pSmbP-LnqQ para la producción del péptido SmbP-LnqQ tanto a 25°C como 37°C (**Figura 18**). Estos ensayos fueron realizados por triplicado.

Esto nos orilló a plantearnos dos posibilidades con relación a la proteína SmbP-LnqQ: la primera era que pudiera presentar problemas por plegamiento durante su producción en células de *E. coli* BL21 (DE3) y que la segunda fuera problemas internos relacionados al IPTG. Para demostrar la primera hipótesis, transformamos células de *E. coli* Origami con el vector de expresión pSmbP-LnqQ y utilizamos el vector pET30a-SmbP\_MP1106 como control positivo, este vector según su autor produce una proteína de un tamaño de 15 kDa en células de *E. coli* Origami debido a que es una proteína problemática (datos no publicados). Nuestra evidencia (**Figura 19**), señala que el IPTG no es causa probable de la nula producción, debido a que se observó una banda muy definida en la región de los 15 kDa para las bacterias transformadas con el vector terminación MP1106 que habían sido inducidas por IPTG tanto a 25°C como 37°C. Tampoco se observó que la cepa Origami contuviera un factor biológico no considerado en la cepa BL21 (DE3) que pudiera agilizar la producción de la proteína SmbP-LnqQ, ya que no encontramos ninguna banda de un tamaño de 15 kDa en las células Origami transformados.

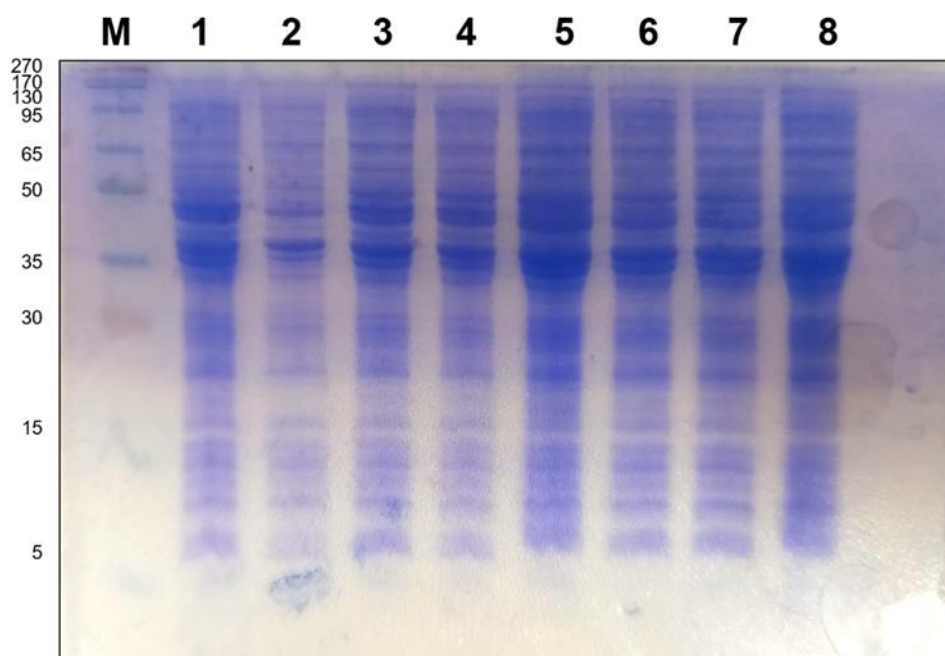
Ante los resultados previos, consideramos posibilidad de que el problema se encontrara específicamente en la cepa de *E. coli* (DE3) presente en nuestro laboratorio. Para demostrar este punto, procedimos a transformarla la cepa con el

vector de expresión pET30NP-Hoc para fines de control positivo para nuestro experimento. Según su autor, este vector de expresión produce una proteína lineal de 95 kDa al inducirse por IPTG a 1 mM (datos no publicados). Nuestros resultados en el gel SDS-PAGE muestran una banda de proteínas extraídas de *E. coli* transformados pET30NP-Hoc en la sección de 95 kDa y es producido tanto a 37°C (**Figura 20**) como a 25°C (**Figura 21**). Sin embargo, no pudimos observar ninguna banda sobre expresada de 10 kDa para las BL21 (DE3) transformadas con pETNL ni una banda tampoco de 15 kDa para las bacterias transformadas con pSmbP-LnqQ. De esta manera, descartamos la idea que existiera un problema biológico procedente en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) mantenida en nuestro laboratorio.

Se conoce que la bacteriocina LnqQ ya ha sido sujeta a modificaciones genéticas para incrementar su producción, al ser clonada y expresada con éxito con el péptido de fusión SUMO en células de *E. coli* BL21 (DE3), registrándose rendimientos hasta de 130 mg por litro de cultivo bacteriano (Ma et al., 2012). Ante la ausencia de una banda de proteínas en la región de 15 kDa en nuestro vector de expresión con péptido de fusión SmbP-LnqQ, se ha comentado que no existen razones para suponer que todas las etiquetas de fusión son aptas para todo tipo de necesidades ya que es casi imposible determinar cuál es el péptido de fusión óptimo para la producción. Sin embargo, una de las ventajas de utilizar péptidos de fusión reconocidos es que son reconocidos sus ventajas y desventajas, ya que en algunos casos, algunos péptidos de fusión pueden incrementar la solubilidad de las proteínas tales como TRX, MBP, NusA, etc., pero otros péptidos señales no incrementan la solubilidad de la proteína de interés como GST, BAP, etc. Incluso, algunos péptidos de fusión pueden incrementar la carga metabólica en la célula como GST, MBP y NusA (Waugh, 2005).

A pesar del buen registro experimental disponible sobre construcciones que contienen el péptido de fusión SmbP (Vargas-Cortez et al., 2016), suponemos en nuestro caso en particular, que dada las limitaciones de su corto historial experimental, aún no existe información que determine las ventajas y desventajas

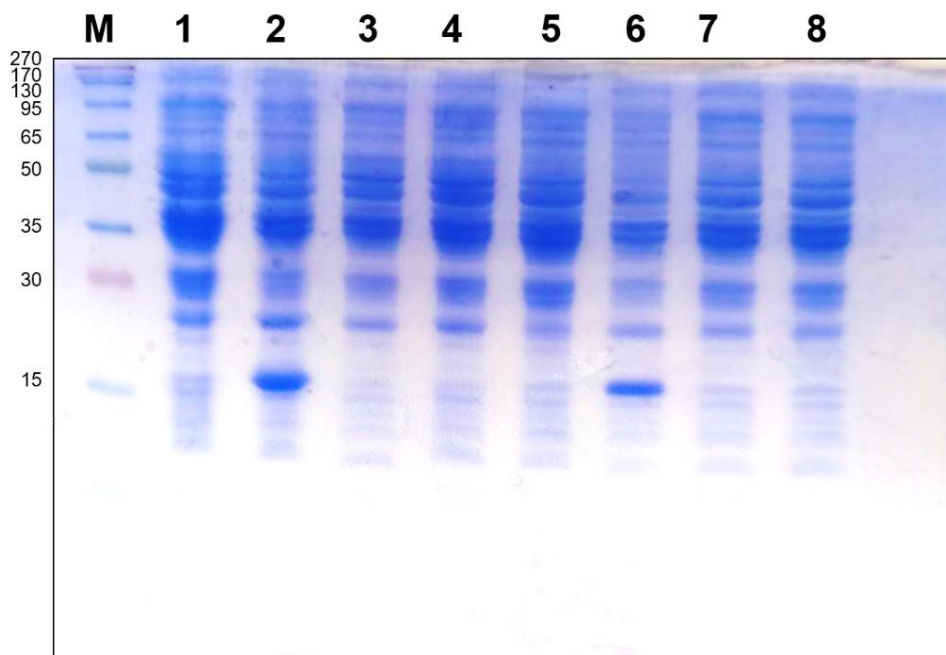
pertinente al péptido de fusión SmbP para observar si son viables para la producción, solubilidad y/o purificación de más tipos de bacteriocinas.



**Figura 18. Gel de *E. coli* BL21 (DE3) pSmbP-LnqQ inducido a 25°C y 37°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_MP1106 sin IPTG a 25°C. Fracción soluble.
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_MP1106 + 0.1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pSmbP-LnqQ + 0.1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pSmbP-LnqQ + 1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
5	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_MP1106 sin IPTG a 37°C. Fracción soluble.
6	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_MP1106 + 0.1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.
7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pSmbP-LnqQ + 0.1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.
8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pSmbP-LnqQ + 1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.
9	Lisozima (14.4 kDa)

Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las proteínas fueron extraídas de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el vector de expresión pET30a-SmbP\_MP1106 como control positivo y el vector pSmbP-LnqQ como experimental. El marcador de peso molecular corresponde a Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (5 kDa to 270 kDa) (Cat. No. M00624, GenScript, Estados Unidos).

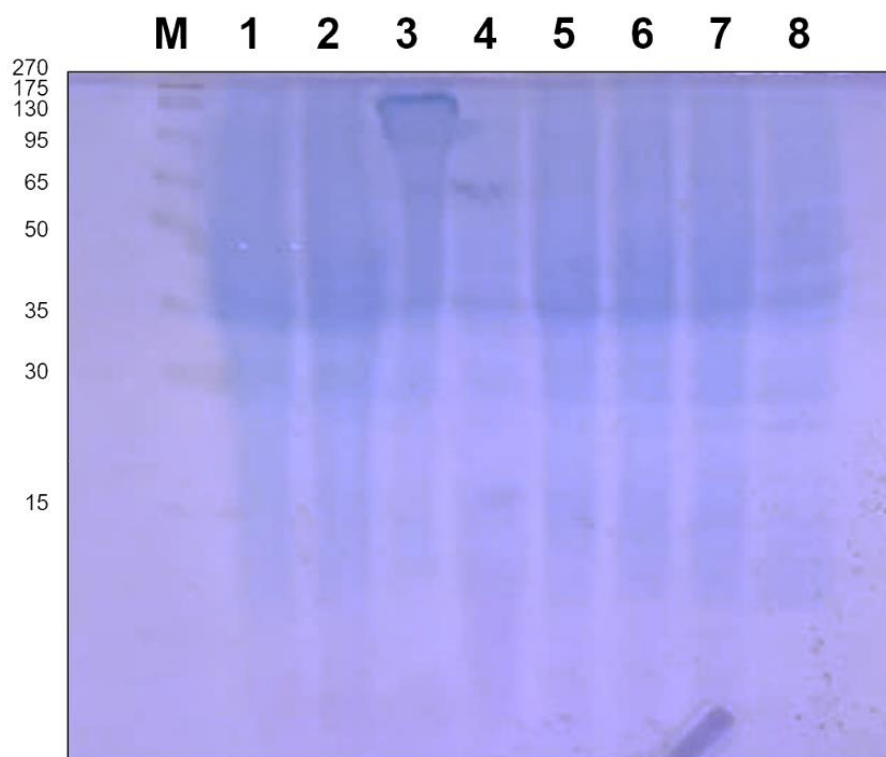


**Figura 19. Gel de *E. coli* Origami pSmbP-LnqQ inducido a 25°C y 37°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> Origami + pET30a-SmbP_MP1106 sin IPTG a 25°C. Fracción soluble.
2	<i>E. coli</i> Origami + pET30a-SmbP_MP1106 + 0.1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
3	<i>E. coli</i> Origami + pSmbP-LnqQ + 0.1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
4	<i>E. coli</i> Origami + pSmbP-LnqQ + 1 mM IPTG a 25°C. Fracción soluble.
5	<i>E. coli</i> Origami + pET30a-SmbP_MP1106 sin IPTG a 37°C. Fracción soluble.
6	<i>E. coli</i> Origami + pET30a-SmbP_MP1106 + 0.1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.
7	<i>E. coli</i> Origami + pSmbP-LnqQ + 0.1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.
8	<i>E. coli</i> Origami + pSmbP-LnqQ + 1 mM IPTG a 37°C. Fracción soluble.

Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las proteínas fueron extraídas de *E. coli* Origami transformados con el vector de expresión pET30a-SmbP\_MP1106 como control positivo y el vector pSmbP-LnqQ como experimental. El marcador de peso molecular corresponde a Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (5 kDa to 270 kDa) (Cat. No. M00624, GenScript, Estados Unidos).

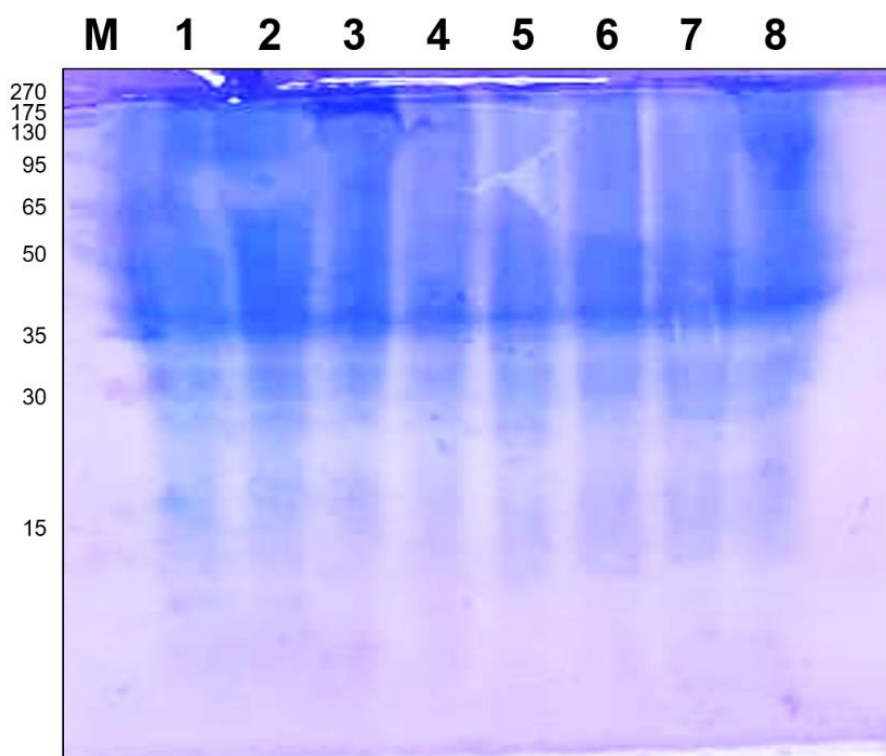




**Figura 20. Gel de *E. coli* BL21 (DE3) con controles inducido a 37°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30NP-Hoc, 37°C
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_LL-37, 37°C
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30NP-Hoc + IPTG 1 mM, 37°C
4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_LL-37 + IPTG 1 mM, 37°C
5	<i>E. coli</i> (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM, 37°C
6	<i>E. coli</i> (DE3) + pETNL + IPTG 1 mM, 37°C
7	<i>E. coli</i> (DE3) + pSmbP-LnqQ + IPTG 0.1 mM, 37°C
8	<i>E. coli</i> (DE3) + pSmbP-LnqQ + IPTG 1 mM, 37°C

Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las bandas son las fracciones solubles de las proteínas extraídas de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pET30NP-Hoc y pET30a-SmbP\_LL-37 como controles positivos y los vectores pETNL y pSmbP-LnqQ como experimentales. El marcador de peso molecular corresponde a Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (5 kDa to 270 kDa) (Cat. No. M00624, GenScript, Estados Unidos).



**Figura 21. Gel de *E. coli* BL21 (DE3) con controles inducido a 25°C**

Rótulo	Descripción
M	Marcador de peso molecular (kDa)
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30NP-Hoc, 25°C
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_LL-37, 25°C
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30NP-Hoc + IPTG 1 mM, 25°C
4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + pET30a-SmbP_LL-37 + IPTG 1 mM, 25°C
5	<i>E. coli</i> (DE3) + pETNL + IPTG 0.1 mM, 25°C
6	<i>E. coli</i> (DE3) + pETNL + IPTG 1 mM, 25°C
7	<i>E. coli</i> (DE3) + pSmbP-LnqQ + IPTG 0.1 mM, 25°C
8	<i>E. coli</i> (DE3) + pSmbP-LnqQ + IPTG 1 mM, 25°C

*Gel de poliacrilamida 16.5% (p/v) adicionado teñido con Coomassie Blue R-250 durante 2 h a 120 V en buffer de corrida 1 X. Las bandas son las fracciones solubles de las proteínas extraídas de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con los vectores de expresión pET30NP-Hoc y pET30a-SmbP\_LL-37 como controles positivos y los vectores pETNL y pSmbP-LnqQ como experimentales. El marcador de peso molecular corresponde a Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard (5 kDa to 270 kDa) (Cat. No. M00624, GenScript, Estados Unidos).*



## 6.19. Presuntas causas de la ausencia de bandas de interés en los geles de proteínas

Según el análisis fisicoquímico de las secuencias aminoacídicas que fueron utilizadas en las construcciones para N-AmyE (**Tabla 12**), todas son de gran tamaño y de alto peso molecular, este péptido se ha reportado para la sobreexpresión de AmyE en *E. coli* (Nakazawa et al., 1986) Así como para la sobreexpresión de una región de 39 kDa que codifica para una región N-terminal de una liasa de pectina (Pnl) en *E. coli* (R. Papi & Kyriakidis, 2003); a la fecha no hemos visto algún reporte de que este péptido señal haya sido utilizado para producir proteínas de bajo peso molecular.

Por otro lado, las secuencias que fueron exitosamente producidos con péptido de fusión SmbP (**Tabla 14**) también han mostrado ser útil para producir proteínas de alto peso molecular o péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana como VpDef (Montfort-Gardeazabal, Claudio, Casillas-Vega, & Zarate, 2020), Bin1b (Montfort-Gardeazabal et al., 2021) y muy recientemente, LL-37 (Perez-Perez et al., 2021), el péptido de fusión también ha demostrado ser exitoso para la sobreproducción de proteínas de alto peso molecular como GFP y RFP (Vargas-Cortez et al., 2016). De esta manera consideramos que tanto el tamaño como el peso molecular no son factores que intervengan durante el proceso sobreproducción mediado tanto N-AmyE como con SmbP. El punto isoeléctrico tampoco parece ser un factor importante ya que el valor de AmyE es ácido (5.61) mientras que Pnl es básico (8.77). Situación similar sucede entre los péptidos microbianos puesto que VpDef es ligeramente ácido (6.86) en cambio, el resto de los péptidos (Bin1b: 9.49; LL-37: 10.61) son básicos, similar a LnqQ.

Sin embargo, observamos que tanto el índice alifático (AI) como los valores del índice de hidrofobicidad (GRAVY) sí son diferentes entre los distintos tipos de péptidos antimicrobianos. Individualmente, el valor AI de LnqQ es de 121.15 (**Tabla 12**) y es superior al resto de los demás péptidos antimicrobianos con una media de  $53.63 \pm 33.21$ ). El valor AI para N-AmyE:LnqQ es de 119.47 (**Tabla 13**) y para SmbP-LnqQ es de 83.23 (**Tabla 15**), respectivamente.

**Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas entre las diferentes proteínas antes de ser acoplados con N-AmyE**

ID	AmyE	Pnl	LnqQ
L	627	316	53
MW	69,297.11	34,486.65	5,898.10
pI	5.61	8.77	10.10
R(-)	69	21	2
R(+)	55	25	8
AI	66.94	76.36	121.15
GRAVY	-0.648	-0.291	+0.300

*ID: identidad del péptido y/o proteína; L: tamaño; MW: peso molecular en Da; pI: punto isoeléctrico; R(-): total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu); R(+): total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys); AI: índice alifático; GRAVY: índice de hidrofobicidad.*

**Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas entre las diferentes proteínas después de ser acoplados con N-AmyE**

ID	N-AmyE:AmyE	N-AmyE:Pnl	N-AmyE:LnqQ
L	660	360	94
MW	72,799.42	39,479.61	10,534.68
pI	5.88	9.22	10.63
R(-)	69	22	2
R(+)	58	30	12
AI	69.82	80.61	119.47
GRAVY	-0.553	-0.205	+0.426

*ID: identidad del péptido y/o proteína; L: tamaño; MW: peso molecular en Da; pI: punto isoeléctrico; R(-): total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu); R(+): total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys); AI: índice alifático; GRAVY: índice de hidrofobicidad.*

**Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas entre las diferentes proteínas antes de ser acoplados con SmbP-LnqQ**

ID	VpDef	Bin1b	LL-37
L	49	45	37
MW	5,434.98	5,209.06	4,493.32
pI	6.86	9.49	10.61
R(-)	6	3	5
R(+)	6	9	11
AI	23.88	47.56	89.46
GRAVY	-0.996	-0.571	-0.724

*ID: identidad del péptido y/o proteína; L: tamaño; MW: peso molecular en Da; pI: punto isoeléctrico; R(-): total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu); R(+): total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys); AI: índice alifático; GRAVY: índice de hidrofobicidad.*

**Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas entre las diferentes proteínas después de ser acoplados con SmbP-LnqQ**

ID	SmbP-VpDef	SmbP-Bin1b	SmbP-LL-37	SmbP-LnqQ
L	152	148	140	155
MW	16,302.68	16,076.75	15,361.02	16,694.71
pI	5.94	6.48	6.45	6.45
R(-)	26	23	25	22
R(+)	16	19	21	18
AI	50.86	58.78	18.28	83.23
GRAVY	-0.938	-0.807	-0.861	-0.514

*ID: identidad del péptido y/o proteína; L: tamaño; MW: peso molecular en Da; pI: punto isoeléctrico; R(-): total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu); R(+): total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys); AI: índice alifático; GRAVY: índice de hidrofobicidad.*

En cuanto al índice de hidrofobicidad, LnqQ mostró un valor GRAVY positivo (+0.300) mientras que el resto de los péptidos antimicrobianos donde el valor GRAVY promedio era de  $-0.73 \pm 0.19$ . No es de sorprender que las bacteriocinas del subgrupo de la familia de las aureocinas similares a A53 como LnqQ, aureocina A53, lacticina Z, epidermicina NI01, lactolisterina BU y BHT-B tengan valores GRAVY positivos (Perez, Zendo, & Sonomoto, 2018). Sin embargo cuando LnqQ está acoplado a N-AmyE, el valor GRAVY se vuelve aún más positivo con +0.426 (**Tabla 13**) y cuando está fusionado con SmbP, el valor GRAVY cambia a -0.514 (**Tabla 15**).

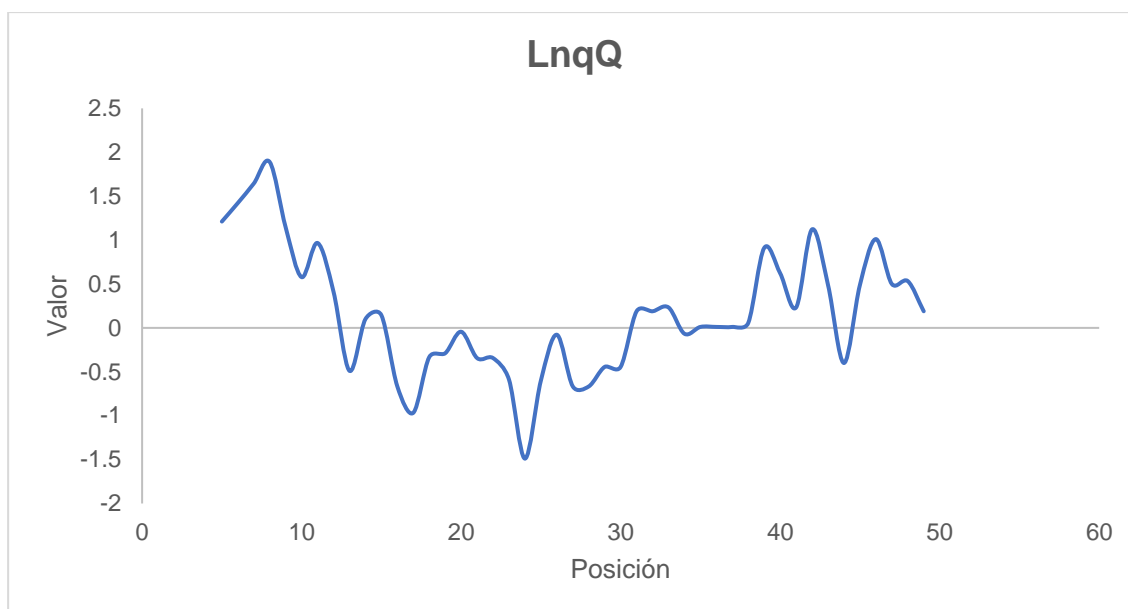
La literatura menciona que un péptido o proteína presenta un valor GRAVY positivo, debe considerarse como hidrofóbica mientras que un valor GRAVY negativo significa que la proteína es hidrofílica (Kyte & Doolittle, 1982). De manera que proteínas con valores GRAVY negativos indican que la proteína presenta una estructura globular (hidrofílicos), mientras que proteínas con valores GRAVY positivos indican la posibilidad que la proteína guarde alguna relación con la membrana (hidrofóbicos) (Enany, 2014).

El valor GRAVY es considerado como el factor que más influye en la movilidad de las proteínas en los geles de SDS-PAGE: una proteína con un valor GRAVY negativo tiende a migrar más lento que las proteínas con valores positivos en los geles para proteínas (Shirai et al., 2008). La unión de las moléculas de SDS con las proteínas se produce a través de los aminoácidos hidrofóbicos (Robinson & Tanford, 2002); algunas estructuras hidrofóbicas son capaces de unir moléculas SDS hasta en un rango desde 3.4 a 10 g de SDS por 1 g de proteína, lo que influiría en una migración electroforética anómala en los geles de SDS-PAGE (Rath, Glibowicka, Nadeau, Chen, & Deber, 2009). LnqQ es una proteína globular (Acedo et al., 2016) que utiliza la membrana específicamente para atacar (Yoneyama, Imura, Ohno, et al., 2009), con lo que suponemos que el índice de hidrofobicidad pudiera estar afectando en el comportamiento electroforético de las proteínas. Sin embargo, también la literatura sugiere que el comportamiento anómalo en las proteínas de membrana en los geles de SDS-PAGE pudiera no

necesariamente relacionado a la carga neta de la proteína ni a su índice de hidrofobicidad (Rath & Deber, 2013).

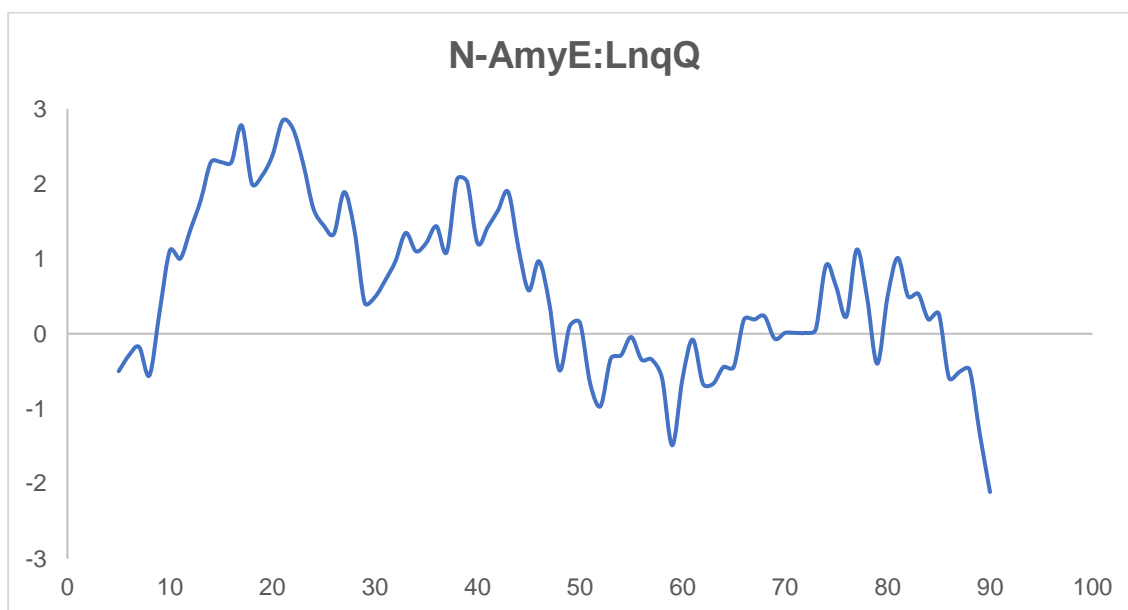
Al evaluar individualmente a LnqQ a través la escala Kyte-Doolittle, observamos que el péptido posee dos secciones hidrofóbicas que se encuentran aproximadamente entre los extremos del péptido (entre residuos 5 al 15 y del 31 al 49), representando el 60% del total de la secuencia de LnqQ es hidrofóbica (**Figura 22**). Si LnqQ está acoplada con N-AmyE, se observan las dos regiones hidrofóbicas (entre residuos 9-50 y 66-85) que representa que el 68.60% del total de la secuencia sea hidrofóbica (**Figura 23**). Mientras tanto, SmbP retiene sus dos regiones hidrofóbicas que se ubican hacia la región C-terminal entre los residuos 103-117 y 133-151, componiendo el 23.13% de total de la secuencia (**Figura 24**).

Dado que existe un reporte de producción exitosa entre la LnqQ acoplada con el péptido de fusión SUMO (Ma et al., 2012), decidimos evaluar su valor AI, GRAVY y su escala Kyte-Doolittle. Según los resultados de ProtParam para SUMO-LnqQ, los valores AI y GRAVY son de 83.37 y -0.516, respectivamente, los cuales son similares a lo reportado para SmbP-LnqQ. Por otro lado, según la escala Kyte-Doolittle, cinco regiones hidrofóbicas fueron descritas a lo largo de toda la construcción y están aproximadamente repartidas en toda la estructura lineal, entre los residuos 16-18, 53-70, 87-91, 119-134 y 150-168, lo que representa el 28% del total de la secuencia (**Figura 25**). El valor GRAVY positivo y el alto porcentaje de residuos hidrofóbicos para N-AmyE:LnqQ nos permite suponer que esta proteína se encontraría anclada en la membrana celular, lo que dificultaría su solubilización en los geles de proteínas.



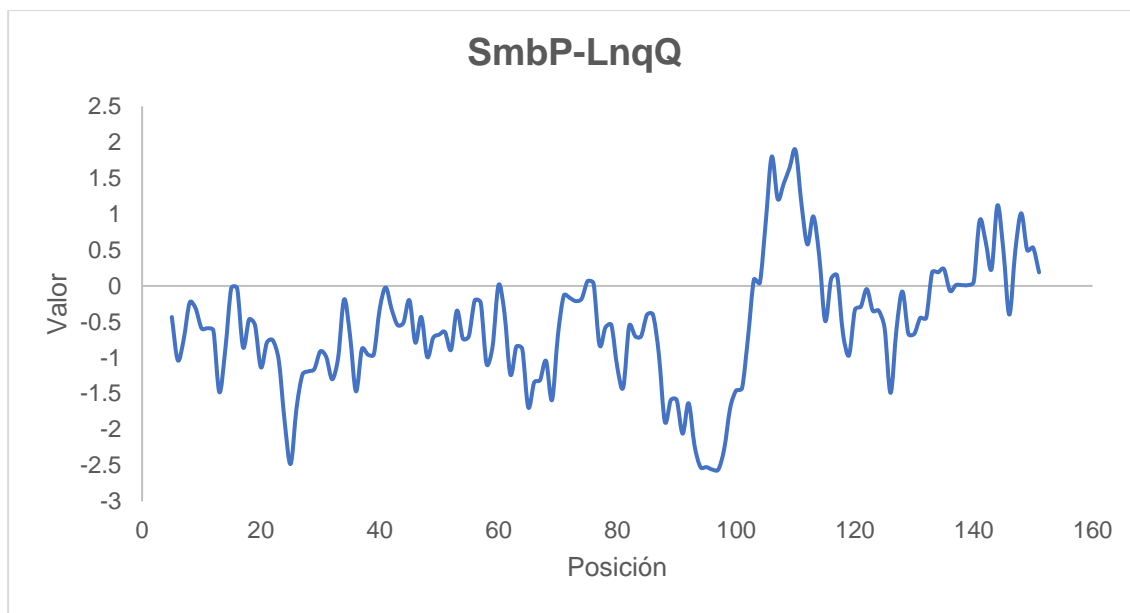
**Figura 22. Perfil de hidrofobicidad Kyte-Doolittle para LnqQ**

*La imagen fue elaborada a partir de los resultados obtenidos en ProtScale de ExPasy y representa el perfil hidrofobicidad de la LnqQ.*



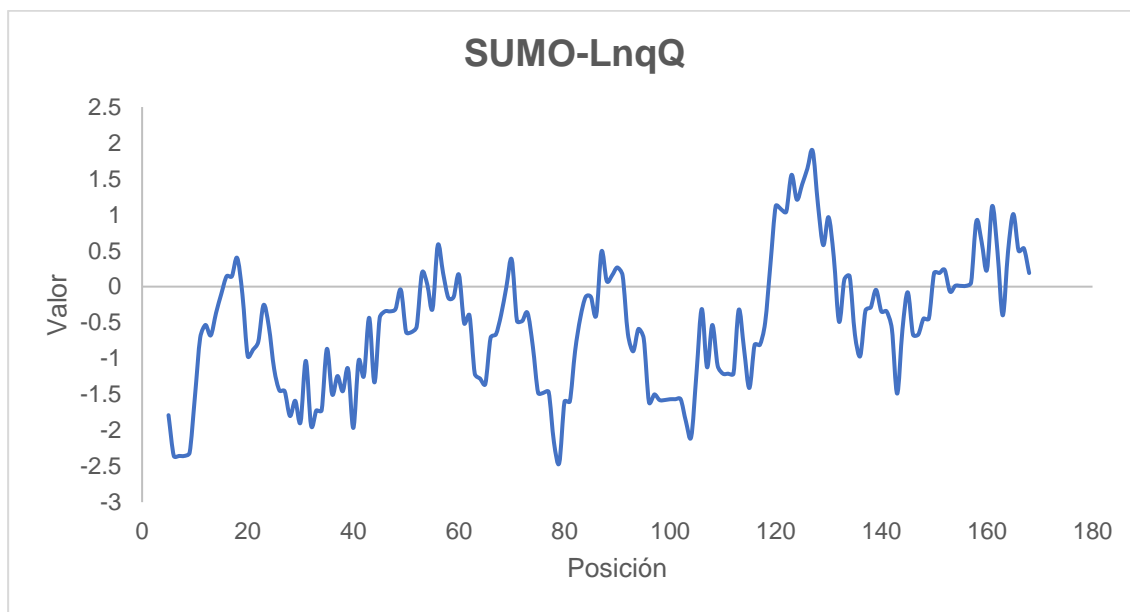
**Figura 23. Perfil de hidrofobicidad Kyte-Doolittle para N-AmyE:LnqQ**

*La imagen fue elaborada a partir de los resultados obtenidos en ProtScale de ExPasy y representa el perfil hidrofobicidad de N-AmyE:LnqQ.*



**Figura 24. Perfil de hidrofobicidad Kyte-Doolittle para SmbP-LnqQ**

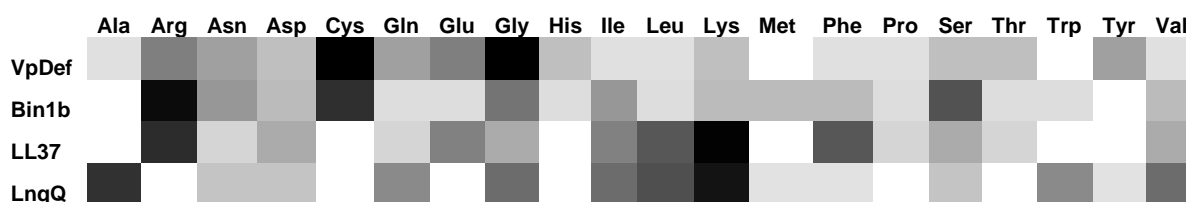
*La imagen fue elaborada a partir de los resultados obtenidos en ProtScale de ExPasy y representa el perfil hidrofobicidad de la SmbP-LnqQ.*



**Figura 25. Perfil de hidrofobicidad Kyte-Doolittle para SUMO-LnqQ**

*La imagen fue elaborada a partir de los resultados obtenidos en ProtScale de ExPasy y representa el perfil hidrofobicidad de la SUMO-LnqQ.*

Ante la ausencia de una respuesta objetiva que explique la ausencia de bandas de SmbP-LnqQ en los ensayos, analizamos el perfil de aminoácidos y detectamos que la presencia de cisteínas entre los péptidos antimicrobianos tampoco fue un factor determinante durante la sobreproducción con la SmbP, ya que tanto VpDef como Bin1b (que se caracterizan por ser abundantes en cisteínas) como LL-37 (que no tiene cisteínas) fueron exitosamente producidos. El mapa de calor (**Figura 26**) señaló un alto porcentaje de Trp en LnqQ en comparación con los demás péptidos antimicrobianos. De acuerdo con la escala Kyte-Doolittle, Trp es considerado un residuo hidrofílico (Kyte & Doolittle, 1982) cuando en realidad es hidrofóbico por sus características únicas (Mishra, Choi, Moon, & Baek, 2018). Este residuo funge como estabilizador de las proteínas en la membranas, anclaje y orientación hacia el lado hidrofílico de la bicapa lipídica (Khemaissa, Sagan, & Walrant, 2021), por eso son de alta importancia en proteínas de membrana porque apoyan en la estabilidad proteína en la interfaz lipídica por su forma rígida y plana (Yau, Wimley, Gawrisch, & White, 1998). Se presume que Trp permite que péptidos antimicrobianos similares a la aureocina A53 se mantengan unidos a la membrana (Netz, Bastos, & Sahl, 2002). Sin embargo, al analizar el porcentaje de Trp entre N-AmyE:LnqQ, SmbP-LnqQ y SUMO-LnqQ, descubrimos que los valores son muy similares: 1.1%, 2.6% y 2.3%. Por lo que Trp no sería un factor clave para que LnqQ sea producido en *E. coli*.



**Figura 26. Perfil aminoacídico de los péptidos antes de acoplarse con SmbPc**

*El mapa de calor representa la distribución de los residuos entre los péptidos. La intensidad del color negro representa el porcentaje de residuos entre los péptidos antes de ser acoplados con SmbP*

Dada la similitud fisicoquímica entre SmbP-LnqQ y SUMO-LnqQ, abordamos el problema desde el punto de vista analítico: otros autores demostraron que proteínas de peso molecular alto como N-AmyE:PnI (R. Papi & Kyriakidis, 2003) o



de peso molecular pequeño como SmbP-Bin1b (Montfort-Gardeazabal et al., 2021), SmbP-VpDef (Montfort-Gardeazabal et al., 2020), SmbP-LL-37 (Perez-Perez et al., 2021) eran fácilmente observables mediante la técnica de SDS-PAGE, hechos que utilizamos para la visualización preliminar tanto N-AmyE:LnqQ como de SmbP-LnqQ en los ensayos electroforéticos. Sin embargo, en el reporte de sobreproducción por SUMO-LnqQ, los ensayos electroforéticos preliminares fueron realizados bajo la técnica SDS-PAGE con Tricina (Ma et al., 2012). Esta variante es utilizada para resolver proteínas con pesos moleculares pequeños que oscilan entre 1 a 30 kDa (Haider, Reid, & Sharp, 2012) pero también es útil para analizar proteínas hidrofóbicas (Schägger, 2006), lo cual sería un candidato *ad hoc* a las *características* fisicoquímicas observadas de la LnqQ.

Por último, y no menos importante, es también de mencionar, todas las secuencias aminoacídicas donde los péptidos antimicrobianos tuvieron éxito con la SmbP tienen su origen evolutivo en sistemas eucarióticos: las defensinas VpDef (Zhang et al., 2015) y Bin1b (Guo et al., 2009) provienen del invertebrado *Venerupis philippinarum* y del epidídimo de la rata *Rattus norvegicus*, respectivamente mientras que la catelicidina LL-37 proviene del sistema inmune de chimpancés y humanos (Agerberth et al., 1995), nuestra LnqQ posee un origen procariota a través de *Lactococcus lactis* QU5 (Fujita et al., 2007). Las defensinas están compuestas por estructuras tipo beta plegadas mediadas por cisteínas conservadas mientras que los dominios antimicrobianos de las catelicidinas son estructuralmente lineales, carentes de puentes disulfuro y están compuestas por varias hélices (Dorin, McHugh, Cox, & Davidson, 2014). LnqQ es una estructura lineal compuesta por dos hélices anfipáticas (Perez et al., 2014), por lo que el factor estructural tampoco sería un factor clave, salvo por el hecho de que provienen de orígenes evolutivos distintos.

A manera de conclusión, de acuerdo con la evidencia recolectada tanto a nivel bioinformático como experimental, encontramos que el marco de lectura de los vectores para la producción de N-AmyE:LnqQ como SmbP-LnqQ estaban correctamente orientados y dispuestos en sus marcos de lecturas

correspondientes, los geles de poliacrilamida sí fueron efectivos para detectar proteínas con un peso similar (lisozima, 14.4 kDa) a los péptidos de nuestras construcciones (N-AmyE:LnqQ= 10.53 kDa y SmbP-LnqQ= 16.69 kDa). Confirmamos que el IPTG sí es capaz de inducir la sobreproducción de proteínas de control tanto en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) como de Origami tanto a 25°C como a 37°C. De manera que tanto N-AmyE:LnqQ como SmbP-LnqQ suponemos que sí son producidas, pero por características fisicoquímicas propias de la LnqQ es posible que: 1) dado su alta hidrofobicidad, es posible que N-AmyE:LnqQ se mantenga acoplada en la membrana celular, lo que dificultaría su solubilización en los geles de SDS-PAGE, 2) desde el punto de vista analítico, es posible que SDS-PAGE no sea la técnica óptima para la visualización de las proteínas hidrofóbicas, 3) no existe información conclusiva que respalde sólidamente porqué SmbP-LnqQ no logró ser sobreproducida utilizando *E. coli* como organismo heterólogo productor.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El biosensor diseñado de células de *E. coli* basado en la detección de moléculas de QS es capaz de producir LnqQ en base a la concentración externa de AIP excretada por MRSA. La capacidad del biosensor está mediada por un vector de expresión diseñado que lleva por nombre Dual Biosensor-Killer. Este plásmido, además, puede ser utilizado para la construcción de otros biosensores que compartan el objetivo de detectar y destruir otros patógenos productores de señales tipo QS. Según nuestros análisis bioinformáticos *in silico*, nuestro biosensor está capacitado para detectar y destruir cepas de *S. aureus* que sean productoras de moléculas de señalización tipo AIP clase II. De acuerdo con nuestros pronósticos, nuestra cepa modificada sería capaz de producir, secretar y ser capaz de ser resistente a la producción de LnqQ, debido a que la maquinaria genética se mantuvo intacto. Nuestros resultados revelan indican que la LnqQ será lo suficientemente soluble cuando sea sobreexpresado. Por último, determinamos que no existen epítomos para células tipo B ni riesgo de alergenidad. De esta manera, la LnqQ producida por este sistema biológico es aparentemente seguro para ser utilizado como un potencial candidato a agente terapéutico. Los resultados *in silico* motivan al desarrollo y diseño de nuevos agentes antimicrobianos a través de biosensores de células enteras para eliminar patógenos tanto sensibles como resistentes a los antibióticos. A pesar de los favorables resultados reportados en publicaciones anteriores y la evidencia predictiva sobre el péptido señal N-AmyE y con el péptido de fusión SmbP para la producción de proteínas recombinantes como la bacteriocina LnqQ, dichas observaciones no pueden ser aplicadas para la producción, expresión y purificación desde células de *E. coli* BL21 (DE3).

## ANEXOS

### Divulgación de la investigación

#### Publicaciones:

**Benítez-Chao, D.F.**, Balderas-Cisneros, F.D.J., León-Buitimea, A. and, Morones-Ramírez, J.R. 2021. Design and *in silico* analysis of a whole-cell biosensor able to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biotechnol. Appl. Biochem. <https://doi.org/10.1002/bab.2210>

**Benítez-Chao, D.F.**, León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J.A. and, Morones-Ramírez, J.R. 2021. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity and Biosafety Assessment by *in vivo* Models. Front. Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695>

## **Archivos de diseño**

Todos los archivos gestionados para los diseños están guardados en su formato correspondiente adentro de la carpeta de “Doctoral – Anexos” la cual fue anexada propiamente en el disco compacto.

Se elaboró una carpeta nombrada “BioBricks and Modules” que contiene información de los resultados para las secciones 6.1 hasta 6.10 y está subdivida en cuatro subcarpetas nombradas como “BioBricks (secuencias originales)”, “Modules”, “Plasmids”, “Templates” y el “Dual Biosensor Killer.dna”. Estos archivos fueron elaborados a través de la aplicación de SnapGene 1.1.3 y están guardados en formato .dna. También, entregamos dos documentos en formato PDF que contienen la secuencia nucleotídica optimizada de todos genes usados para el módulo de biosensor y para el módulo de bacteriocina.

Se creó una carpeta nombrada “Signal and fusion peptides” que contiene información de los resultados para las secciones 6.11 hasta 6.18 y en esta se encontrará la subcarpeta “Mapa Genético de vectores de expresión de expresión pETNL y pSmbP-LnqQ”. Además, se entregaron tres archivos PDF donde dos de éstos archivos contienen datos predictivos de la estructura secundaria y terciaria de los productos de pETNL “Phyre2 pETNL.pdf” y de pSmbP-LnqQ “Phyre2 pSmbP-LnqQ” a través de la aplicación en línea Phyre2 y el otro archivo PDF “Simulación agarosa 1%.pdf” que contiene una simulación en gel de agarosa 1% (p/v) de los productos lineales de los vectores de expresión pET30a(+), pETNL y pSmbP-LnqQ. En la carpeta de este capítulo también se entregaron cinco archivos en formato .dna que contienen la información nucleotídica de la construcción de los vectores de expresión cuyos nombres son “pET30(a)-NAmyE-LnqQ pETNL.pdf”, “pET-30a(+).pdf”, “pET-30a(+)-N-AmyE.pdf”, “pET30a-SmbP.pdf” y “pSmbP-LnqQ GFJBC01.pdf”. Todos los archivos están marcados con sus respectivas características.

## **Resumen autobiográfico**

**M.C. Diego Francisco Benítez Chao**

**Candidato** para el grado de

**Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada**

**Tesis:** Control poblacional y oscilatorio utilizando el *Quorum Sensing* de *Staphylococcus aureus* mediante un circuito genético de *Escherichia coli*.

**Edad:** 31 años.

**Campo de estudio:** Desarrollo de agentes terapéuticos y biología sintética.

**Biografía:** Nacido en Monterrey, Nuevo León, el día 24 de julio de 1990, hijo de María Guadalupe Chao Soto y Alejandro Benítez Villegas.

**Educación:** Egresado de Licenciado en Biotecnología Genómica (UANL) en el 2013 y Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología (UANL) en 2015.

## REFERENCIAS

- Acedo, J. Z., Van Belkum, M. J., Lohans, C. T., Towle, K. M., Miskolzie, M., & Vederas, J. C. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Solution Structures of Lacticin Q and Aureocin A53 Reveal a Structural Motif Conserved among Leaderless Bacteriocins with Broad-Spectrum Activity. *Biochemistry*, 55(4), 733–742. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01306>
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., & Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 195–199. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.195>
- Aguilar-Pérez, C., Gracia, B., Rodrigues, L., Vitoria, A., Cebrián, R., Deboosère, N., ... Aínsaa, J. A. (2018). Synergy between circular bacteriocin AS-48 and ethambutol against mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00359-18>
- Al Atya, A. K., Belguesmia, Y., Chataigne, G., Ravallec, R., Vachée, A., Szunerits, S., ... Drider, D. (2016). Anti-MRSA activities of enterocins DD28 and DD93 and evidences on their role in the inhibition of biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00817>
- Allen, H. K., Trachsel, J., Looft, T., & Casey, T. A. (2014). Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1), 91–100. <https://doi.org/10.1111/nyas.12468>
- Amabile-Cuevas, C. F. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: A brief overview of the current status and its causes. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(3), 126–131.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). Properties , regulation and roles in human disease Staphylococcus aureus biofilms, (October), 445–459.

- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 2019 37:4, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays In Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/ebc20160063>
- Atsushi, I. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895–1898. Recuperado de [https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/88/6/88\\_6\\_1895/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/88/6/88_6_1895/_article)
- Baindara, P., Singh, N., Ranjan, M., Nallabelli, N., Chaudhry, V., Pathania, G. L., ... Korpole, S. (2016). Laterosporulin10: A novel defensin like class iid bacteriocin from *brevibacillus* sp. strain SKDU10 with inhibitory activity against microbial pathogens. *Microbiology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000316>
- Balagaddé, F. K., Song, H., Ozaki, J., Collins, C. H., Barnet, M., Arnold, F. H., ... You, L. (2008). A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Molecular Systems Biology*, 4(187), 1–8. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.24>
- Bao, Q., Li, X., Han, G., Zhu, Y., Mao, C., & Yang, M. (2019). Phage-based vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.013>
- Barney, B. M., LoBrutto, R., & Francisco, W. A. (2004). Characterization of a small metal binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi049318k>
- Barrett, F. F., McGehee, R. F., & Finland, M. (1968). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *The New England journal of medicine*, 279(9), 441–448. <https://doi.org/10.1056/NEJM196808292790901>



- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7001623>
- Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., & Strickler, J. E. (2013, noviembre 1). To fuse or not to fuse: What is your purpose? *Protein Science*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.2356>
- Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2021, abril 15). Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695>
- Benítez-Chao, D. F., Balderas-Cisneros, F. de J., León-Buitimea, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2021). Design and in silico analysis of a whole-cell biosensor able to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, bab.2210. <https://doi.org/10.1002/bab.2210>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000, enero 1). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Biedenbach, D. J., Moet, G. J., & Jones, R. N. (2004). Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.003>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Borrero, J., Chen, Y., Dunny, G. M., & Kaznessis, Y. N. (2015). Modified lactic acid bacteria detect and inhibit multiresistant enterococci. *ACS Synthetic Biology*,

4(3), 299–306. <https://doi.org/10.1021/sb500090b>

- Brophy, J. A. N., & Voigt, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. *Nature Methods*, 11(5), 508–520. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2926>
- Cabral, D. J., Penumutthu, S., Norris, C., Morones-Ramirez, J. R., & Belenky, P. (2018). Microbial competition between *Escherichia coli* and *Candida albicans* reveals a soluble fungicidal factor. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 5(5), 249–255. <https://doi.org/10.15698/mic2018.05.631>
- Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014). A brief history of synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3239>
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., ... Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- CDC. (2019). Biggest Threats and Data. 2019 AR Threats Report.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018, febrero). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1240>

- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., ... Cui, H. (2012). Class Ila bacteriocins: Diversity and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Davidson, J. R., & De Montellano, B. R. O. (1983). The antibacterial properties of an aztec wound remedy. *Journal of Ethnopharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90051-X](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90051-X)
- Davies, J. (2006). Where have all the antibiotics gone? En *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>
- De Smet, K., & Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0936-5>
- de Souza, T. K., Soares, S. S., Benitez, L. B., & Rott, M. B. (2017). Interaction Between Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. *Current Microbiology*, 74(5), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1196-z>
- Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Misiūnas, A., Stočkūnaitė, B., Starkevič, U., Vitkauskienė, A., ... Ražanskienė, A. (2019). Broad and Efficient Control of *Klebsiella* Pathogens by Peptidoglycan-Degrading and Pore-Forming Bacteriocins Klebicins. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51969-1>
- Dorin, J. R., McHugh, B. J., Cox, S. L., & Davidson, D. J. (2014). Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins. En *Molecular Medical*

- Microbiology: Second Edition* (Vol. 1–3, pp. 539–565). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00030-5>
- Duffy, B., Schouten, A., & Raaijmakers, J. M. (2003, septiembre). Pathogen Self-Defense: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155–166. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932228>
- Dupin, A., & Simmel, F. C. (2019). Signalling and differentiation in emulsion-based multi-compartmentalized in vitro gene circuits. *Nature Chemistry*. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0174-9>
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Emori, M., & Maruo, B. (1988). Complete nucleotide sequence of an alpha-amylase gene from *Bacillus subtilis* 2633, an alpha-amylase extrahyperproducing strain. *Nucleic Acids Research*, 16(14B), 7178. <https://doi.org/10.1093/NAR/16.14.7178>
- Enany, S. (2014). Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. *Journal of Infection and Public Health*, 7(4), 296–307. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2014.02.002>
- Escárcega-González, C. E., Garza-Cervantes, J. A., Vázquez-Rodríguez, A., Montelongo-Peralta, L. Z., Treviño-González, M. T., Díaz Barriga Castro, E., ... Morones-Ramírez, J. R. (2018). In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *acacia rigidula* as a reducing and capping agent. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S160605>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2009). ECDC/EMEA Joint

Technical Report: The bacterial challenge: time to react. Recuperado el 8 de octubre de 2020, de <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdcemea-joint-technical-report-bacterial-challenge-time-react>

Everett, J. A., & Rumbaugh, K. P. (2014). Biofilms, Quorum Sensing and Crosstalk in Medically Important Microbes. En *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00012-3>

Fahim, H. A., Khairalla, A. S., & El-Gendy, A. O. (2016). Nanotechnology: A valuable strategy to improve bacteriocin formulations. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01385>

Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6(6), 25–64. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>

FAO. (s/f). Antimicrobial resistance. Recuperado el 30 de enero de 2020, de <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/background/what-is-it/en/>

Fields, F., Manzo, G., Hind, C., Janardhanan, J., Foik, I. P., Do Carmo Silva, P., ... Lee, S. W. (2020). Synthetic antimicrobial peptide tuning permits membrane disruption and interpeptide synergy. *ACS Pharmacology & Translational Science*. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00001>

Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujju, S., & O'Toole, G. A. (2015). Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *Journal of Bacteriology*, 197(14), 2252–2264. <https://doi.org/10.1128/JB.00059-15>

Fleming, A. (1929). On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*, 226–236. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/pdf/brjexppathol00255-0037.pdf>

- Fleming, A. (1945). Penicillin. *Nobel Prize Organization*, (Nobel Lecture), 83–93. Recuperado de <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>
- Foster, T. (1996). *Staphylococcus. Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413338>
- Frieden, T. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 114. <https://doi.org/CS239559-B>
- Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., ... Mäder, U. (2017). AureoWiki - The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *International Journal of Medical Microbiology*, (November), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.011>
- Fuchs, S. W., Jaskolla, T. W., Bochmann, S., Kötter, P., Wichelhaus, T., Karas, M., ... Entian, K.-D. (2011). Entianin, a Novel Subtilin-Like Lantibiotic from *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* DSM 15029 T with High Antimicrobial Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1698–1707. <https://doi.org/10.1128/AEM.01962-10>
- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2871–2877. <https://doi.org/10.1128/AEM.02286-06>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, 176(2), 269–275. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288518>
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2014). Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02284-14>

- Galdzicki, M., Rodriguez, C., Chandran, D., Sauro, H. M., & Gennari, J. H. (2011). Standard Biological Parts Knowledgebase. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017005>
- García-Granados, R., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Metabolic Engineering and Synthetic Biology: Synergies, Future, and Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 36. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00036>
- García-Nafria, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep27459>
- Gardner, A. M. N., Oxon, B. M., Stamp, M., Bowgen, J. A., & Moore, B. (1962). Infection control sister. A New Member of the Control of Infection Team in General Hospitals. *Nursing times*, 280(7258), 710–711. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(62\)90520-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(62)90520-2)
- Garg, N., Manchanda, G., & Kumar, A. (2014). Bacterial quorum sensing: Circuits and applications. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(2), 289–305. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0082-3>
- Garnier-Rocha, C. G. (2019). Biosensores: Detección de contaminantes en muestras ambientales. *Revista de Divulgación Científica Tecnológica y Humanística de COCyTED*. Recuperado de <http://cocytcd.mx/REVISTASAPIENS/ejemplares/actual/04.Biosensores.pdf>
- Garza-Cervantes, Javier A., Chávez-Reyes, A., Castillo, E. C., García-Rivas, G., Antonio Ortega-Rivera, O., Salinas, E., ... Morones-Ramírez, J. R. (2017). Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments. *Scientific Reports*, 7(1), 903. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01017-7>
- Garza-Cervantes, Javier Alberto, Escárcega-González, C. E., Díaz Barriga Castro, E., Mendiola-Garza, G., Marichal-Cancino, B. A., López-Vázquez, M. A., &

- Morones-Ramirez, J. R. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity of biopolymer-Ni, Zn nanoparticle biocomposites synthesized using *R. mucilaginosa* UANL-001L exopolysaccharide as a capping agent. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196470>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En J. . Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press, Totowa, NJ. Recuperado de [https://web.expasy.org/docs/expasy\\_tools05.pdf](https://web.expasy.org/docs/expasy_tools05.pdf)
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Ghosh, S., Rasheedi, S., Rahim, S. S., Banerjee, S., Choudhary, R. K., Chakhaiyar, P., ... Hasnain, S. E. (2004). Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/04373st07>
- Gomes-Fernandes, M., Laabei, M., Pagan, N., Hidalgo, J., Molinos, S., Villar Hernandez, R., ... Prat, C. (2017). Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PLoS ONE*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175552>
- Gonzalez, D. J., Haste, N. M., Hollands, A., Fleming, T. C., Hamby, M., Pogliano, K., ... Dorrestein, P. C. (2011). Microbial competition between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* monitored by imaging mass spectrometry. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 9), 2485–2492. <https://doi.org/10.1099/mic.0.048736-0>
- Gonzalez, D. J., Lee, S. W., Hensler, M. E., Markley, A. L., Dahesh, S., Mitchell, D. A., ... Dorrestein, P. C. (2010). Clostridiolysin S, a post-translationally modified biotoxin from *Clostridium botulinum*. *The Journal of biological chemistry*, 285(36), 28220–28228. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118554>



- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>
- Grundstad, M. L., Parlet, C. P., Kwiecinski, J. M., Kavanaugh, J. S., Crosby, H. A., Cho, Y.-S., ... Horswill, A. R. (2019). Quorum Sensing, Virulence, and Antibiotic Resistance of USA100 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *mSphere*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00553-19>
- Guo, C., Diao, H., Lian, Y., Yu, H., Gao, H., Zhang, Y., & Lin, D. (2009). Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E. *Journal of Biotechnology*, 139(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2008.10.003>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599–1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Gupta, S., Bram, E. E., & Weiss, R. (2013). Genetically programmable pathogen sense and destroy. *ACS Synthetic Biology*, 2(12), 715–723. <https://doi.org/10.1021/sb4000417>
- Gutiérrez, D., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2019). Role of bacteriophages in the implementation of a sustainable dairy chain. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00012>
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, 869, 81–91. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8)
- Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: A database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-22>
- Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: A web tool for predicting protein solubility from sequence.

*Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>

- Herbert, S., Ziebandt, A.-K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., ... Götz, F. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infection and immunity*, 78(6), 2877–2889. <https://doi.org/10.1128/IAI.00088-10>
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340–346. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621002>
- Holowko, M. B., Wang, H., Jayaraman, P., & Poh, C. L. (2016). Biosensing *Vibrio cholerae* with Genetically Engineered *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 5(11), 1275–1283. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00079>
- Hols, P., Ledesma-García, L., Gabant, P., & Mignolet, J. (2019). Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.007>
- Horswill, A. R., Stoodley, P., Stewart, P. S., & Parsek, M. R. (2007). The effect of the chemical , biological , and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities, 371–380. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0720-y>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020, octubre 16). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hulanicki, A., Glab, S., & Ingman, F. (1991). CHEMICAL SENSORS. DEFINITIONS AND CLASSIFICATION. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 63(9), 1247–1250. Recuperado de <http://publications.iupac.org/pac/pdf/1991/pdf/6309x1247.pdf>

- Ishibashi, N., Himeno, K., Masuda, Y., Perez, R. H., Iwatani, S., Zendo, T., ... Sonomoto, K. (2014). Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-14>
- IUPAC. (1992). biosensor. En *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC. <https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663>
- Iwatani, S., Horikiri, Y., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2013). Bifunctional gene cluster InQBCDEF mediates bacteriocin production and immunity with differential genetic requirements. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.03783-12>
- Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2012). Identification of the genes involved in the secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062943-0>
- Jassim, S. A. A., Limoges, R. G., & El-Cheikh, H. (2016). Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2028-1>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Ji, G., Pei, W., Zhang, L., Qiu, R., Lin, J., Benito, Y., ... Novick, R. P. (2005). *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3139-3150.2005>
- Jiang, H., Zou, J., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2017). Purification, Characterization, and Mode of Action of Pentocin JL-1, a Novel Bacteriocin Isolated from *Lactobacillus pentosus*, against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/7657190>

- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kavanagh, K. T. (2019). Control of MSSA and MRSA in the United States: Protocols, policies, risk adjustment and excuses. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0550-2>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Khemaissa, S., Sagan, S., & Walrant, A. (2021). Tryptophan, an Amino-Acid Endowed with Unique Properties and Its Many Roles in Membrane Proteins. *Crystals* 2021, Vol. 11, Page 1032, 11(9), 1032. <https://doi.org/10.3390/CRYST11091032>
- King, J. M., Kulhankova, K., Stach, C. S., Vu, B. G., & Salgado-Pabón, W. (2016). Phenotypes and Virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 Clonal Lineages. *mSphere*, 1(3). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00071-16>
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4)
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., ... Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://doi.org/10.2807/es.e15.41.19688-en>
- Koetsier, G., Cantor, E., & Biolabs, E. (s/f). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers.
- Koulenti, Xu, Mok, Song, Karageorgopoulos, Armaganidis, ... SotiriosTsiodras. (2019). Novel Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. *Microorganisms*, 7(8), 270.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7080270>

Kringelum, J. V., Lundegaard, C., Lund, O., & Nielsen, M. (2012). Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002829>

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., ... Danchin, & A. (1997). *The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. *Nature* © Macmillan Publishers Ltd (Vol. 390). Recuperado de <http://www.tigr.org>

Kurlenda, J., & Grinholc, M. (2012). Alternative therapies in staphylococcus aureus diseases. *Acta Biochimica Polonica*. [https://doi.org/10.18388/abp.2012\\_2136](https://doi.org/10.18388/abp.2012_2136)

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., ... Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

Ladjouzi, R., Lucau-Danila, A., Benachour, A., & Drider, D. (2020). A Leaderless Two-Peptide Bacteriocin, Enterocin DD14, Is Involved in Its Own Self-Immunity: Evidence and Insights. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00644>

Lambert, T. J. (2019). FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>

Larentis, A. L., Nicolau, J. F. M. Q., Esteves, G. D. S., Vareschini, D. T., De Almeida, F. V. R., Dos Reis, M. G., ... Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and

- microbioreactor. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-671>
- Le, K. Y., & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology*, 6, 1174. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
- Lei, J., Sun, L. C., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., ... He, Q. Y. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*.
- Li, M., Yoneyama, F., Toshimitsu, N., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2013). Lethal hydroxyl radical accumulation by a lactococcal bacteriocin, lacticin q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3897–3902. <https://doi.org/10.1128/AAC.00638-13>
- Limbago, B., Fosheim, G. E., Schoonover, V., Crane, C. E., Nadle, J., Petit, S., ... Fridkin, S. K. (2009). Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected in 2005 and 2006 from Patients with Invasive Disease: a Population-Based Analysis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 47(5), 1344–1351. <https://doi.org/10.1128/JCM.02264-08>
- Lubkowitz, D., Ho, C. L., Hwang, I. Y., Yew, W. S., Lee, Y. S., & Chang, M. W. (2018). Reprogramming Probiotic *Lactobacillus reuteri* as a Biosensor for *Staphylococcus aureus* Derived AIP-I Detection. *ACS Synthetic Biology*, 7, 1229–1237. rapid-communication. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00063>
- Lynch, D., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Hill, C., Field, D., & Begley, M. (2019). Identification and characterisation of capidermicin, a novel bacteriocin produced by *Staphylococcus capitis*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223541>
- Ma, Q., Yu, Z., Han, B., Wang, Q., & Zhang, R. (2012). Expression and purification of lacticin Q by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, 50(2), 326–331. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1425-x>

- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., ... Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Malakar, P., & Venkatesh, K. V. (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3642-3>
- Manna, A. C., Bayer, M. G., & Cheung, A. L. (1998). Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*.
- Marchand, N., & Collins, C. H. (2013). Peptide-based communication system enables *Escherichia coli* to *Bacillus megaterium* interspecies signaling. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(11), 3003–3012. <https://doi.org/10.1002/bit.24975>
- Maurer-Stroh, S., Krutz, N. L., Kern, P. S., Gunalan, V., Nguyen, M. N., Limviphuvadh, V., ... Frank Gerberick, G. (2019). AllerCatPro-prediction of protein allergenicity potential from the protein sequence. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz029>
- McAuliffe, O., Ryan, M. P., Ross, R. P., Hill, C., Breeuwer, P., & Abee, T. (1998). Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 439–445.
- Mesa-Pereira, B., O'Connor, P. M., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). Controlled functional expression of the bacteriocins pediocin PA-1 and bactofencin A in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02868-w>
- Mesa-Pereira, B., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2018). Heterologous Expression of Biopreservative Bacteriocins With a View to Low Cost Production. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1654.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01654>

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2002). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mishra, A. K., Choi, J., Moon, E., & Baek, K.-H. (2018). Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23040815>
- Montelongo-Peralta, L. Z., León-Buitimea, A., Palma-Nicolás, J. P., Gonzalez-Christen, J., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Antibacterial Activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 9(1), 5471. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42049-5>
- Montfort-Gardeazabal, J. M., Balderas-Renteria, I., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2021). Expression and purification of the antimicrobial peptide Bin1b in *Escherichia coli* tagged with the fusion proteins CusF3H+ and SmbP. *Protein Expression and Purification*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105784>
- Montfort-Gardeazabal, J. M., Claudio, P. C. M.-S., Casillas-Vega, N. G., & Zarate, X. (2020). Expression and Purification of the VpDef Defensin in *Escherichia coli* using the Small Metal-Binding Proteins CusF3H+ and SmbP. *Protein & Peptide Letters*, 28(1), 108–114. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200610133407>
- Mulcahy, M. E., & McLoughlin, R. M. (2016). Host–Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends in Microbiology*, 24(11), 872–886. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.012>
- Nakazawa, K., Takano, T., Sohma, A., & Yamane, K. (1986). Secretion activities of *Bacillus subtilis* alpha-amylase signal peptides of different lengths in *Escherichia coli* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 134(2), 624–631. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3080993/>



- Nascimento, J. dos S., Coelho, M. L. V., Ceotto, H., Potter, A., Fleming, L. R., Salehian, Z., ... de Freire Bastos, M. do C. (2012). Genes involved in immunity to and secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.06203-11>
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1735–1756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.015>
- Ndihokubwayo, J. B., Yahaya, A. A., Desta, A. T., Ki-Zerbo, G., Odei, E. A., Keita, B., ... Nkhoma, W. (2013). *Antimicrobial resistance in the African Region: Issues, challenges and actions proposed*. Recuperado de <http://www.who.int/bulletin/>
- Netz, D. J. A., Bastos, M. do C. de F., & Sahl, H.-G. (2002). Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5274. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5274-5280.2002>
- Newstead, L. L., Varjonen, K., Nuttall, T., & Paterson, G. K. (2020, febrero 1). Staphylococcal-produced bacteriocins and antimicrobial peptides: Their potential as alternative treatments for staphylococcus aureus infections. *Antibiotics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020040>
- Nicola, G., & Abagyan, R. (2009, febrero 1). Structure-based approaches to antibiotic drug discovery. *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc1702s12>
- NNIS. (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control*. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.10.001>
- O'Neill, J. (2016). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and

wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.

- Oldham, E. R., & Daley, M. J. (1991). Lysostaphin: Use of a Recombinant Bactericidal Enzyme as a Mastitis Therapeutic. *Journal of Dairy Science*, 74(12), 4175–4182. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78612-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78612-8)
- Panlilio, A. L., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Banerjee, S., Henderson, T. S., Tolson, J. S., & Martone, W. J. (1992). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. Hospitals, 1975–1991. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. <https://doi.org/10.1086/646432>
- Papi, R., & Kyriakidis, D. (2003). Overexpression of the pectin lyase gene of *Pseudomonas marginalis* in *Escherichia coli* and purification of the active enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 187–194. <https://doi.org/10.1042/>
- Papi, R. M., Chaitidou, S. A., Trika, F. A., & Kyriakidis, D. A. (2005). Encapsulated *Escherichia coli* in alginate beads capable of secreting a heterologous pectin lyase. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-35>
- Perez-Perez, D. A., Pioquinto-avila, E., Arredondo-espinoza, E., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2020). Engineered small metal-binding protein tag improves the production of recombinant human growth hormone in the periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Journal*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12808>
- Perez-Perez, D. A., Villanueva-Ramirez, T. de J., Hernandez-Pedraza, A. E., Casillas-Vega, N. G., Gonzalez-Barranco, P., & Zarate, X. (2021). The Small Metal-Binding Protein SmbP Simplifies the Recombinant Expression and Purification of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 1271, 10(10), 1271. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101271>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>

- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 0(SEP), 2085. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02085>
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS immunology and medical microbiology*, 59(3), 493–503. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00710.x>
- Podolsky, S. H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0181-x>
- Potter, H., & Heller, R. (2003). Transfection by electroporation. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 9, Unit 9.3. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>
- Qu, J., Huang, Y., & Lv, X. (2019). Crisis of antimicrobial resistance in China: Now and the future. *Frontiers in Microbiology*, 10(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02240>
- Quave, C. L., & Horswill, A. R. (2014). Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Frontiers in microbiology*, 5, 706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00706>
- Rajasree, K., Fasim, A., & Gopal, B. (2016). Conformational features of the *Staphylococcus aureus* AgrA-promoter interactions rationalize quorum-sensing triggered gene expression. *Biochemistry and Biophysics Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.012>
- Ramanan, R. N., Tan, J. S., Mohamed, M. S., Ling, T. C., Tey, B. T., & Ariff, A. B.

- (2010). Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- $\alpha$ 2b from *Escherichia coli* using response surface method. *Process Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.007>
- Rath, A., & Deber, C. M. (2013). Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 434(1), 67–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.007>
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1760–1765.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., & Saiman, L. (2009). Respiratory Microbiology of Patients With Cystic Fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 136(6), 1554–1560. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0132>
- Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., & Hill, C. (2011). Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. En *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* (pp. 29–53). New York, NY: Springer New York.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_3)
- Reynolds, J., & Wigneshweraraj, S. (2011). Molecular insights into the control of transcription initiation at the staphylococcus aureus agr operon. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), 862–881. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.018>
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*.  
<https://doi.org/10.1086/533452>
- Riley, M. A., Robinson, S. M., Roy, C. M., Dennis, M., Liu, V., & Dorit, R. L. (2012). Resistance is futile: The bacteriocin model for addressing the antibiotic

resistance challenge. En *Biochemical Society Transactions*.  
<https://doi.org/10.1042/BST20120179>

Roberts, J. C. (2013). Community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus epidemic clone USA100; more than a nosocomial pathogen.  
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-133>

Robinson, N. C., & Tanford, C. (2002). Binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5. *Biochemistry*, 14(2), 369–378. <https://doi.org/10.1021/BI00673A025>

Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L., ... Gotuzzo, E. (2010). Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.08.018>

Ruben Morones, J., & Frey, W. (2007). Environmentally sensitive silver nanoparticles of controlled size synthesized with PNIPAM as a nucleating and capping agent. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la7008336>

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 1–25. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>

Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro; *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409–6412. <https://doi.org/10.1093/NAR/18.21.6409>

Saeidi, N., Wong, C. K., Lo, T. M., Nguyen, H. X., Ling, H., Leong, S. S. J., ... Chang, M. W. (2011). Engineering microbes to sense and eradicate Pseudomonas aeruginosa, a human pathogen. *Molecular Systems Biology*, 7(521), 1–11. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.55>

Sakakibara, Y., Tsutsumi, K., Nakamura, K., & Yamane, K. (1993). Structural requirements of Bacillus subtilis  $\alpha$ -amylase signal peptide for efficient processing: In vivo pulse-chase experiments with mutant signal peptides.

*Journal of Bacteriology*, 175(13), 4203–4212.

- Sandiford, S., & Upton, M. (2012). Identification, characterization, and recombinant expression of epidermin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1539–1547. <https://doi.org/10.1128/AAC.05397-11>
- Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1335>
- Santos, BD, Morones-Ramirez, J., Balderas-Renteria, I., Casillas-Vega, N., Galbraith, D., & Zarate, X. (2019). Optimizing Periplasmic Expression in *Escherichia coli* for the Production of Recombinant Proteins Tagged with the Small Metal-Binding Protein SmbP. *Molecular Biotechnology*, 61, 451–460. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12033-019-00176-4.pdf>
- Santos, Byran. (2017). *Optimización de la secuencia señal para la producción de proteínas recombinantes en el periplasma de Escherichia coli marcadas con SMBP*. *Journal of Personality and Social Psychology*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Savojardo, C., Martelli, P. L., Fariselli, P., Profiti, G., & Casadio, R. (2018). BUSCA: An integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky320>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols* 2006 1:1, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schein, C. H. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Bio/Technology* 1989 7:11, 7(11), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>
- Sedlmayer, F., Hell, D., Müller, M., Ausländer, D., & Fussenegger, M. (2018).

- Designer cells programming quorum-sensing interference with microbes. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04223-7>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., & Anderson, M. A. (2016). The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>
- Shao, W., Price, M. N., Deutschbauer, A. M., Romine, M. F., & Arkin, A. P. (2014). Conservation of transcription start sites within genes across a bacterial genus. *mBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01398-14>
- Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., ... Yoshida, M. (2008). Global Analysis of Gel Mobility of Proteins and Its Use in Target Identification \*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10745–10752. <https://doi.org/10.1074/JBC.M709211200>
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., ... Kreiswirth, B. N. (2003). Prevalence of agr specificity groups among Staphylococcus aureus strains colonizing children and their guardians. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 456–459. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517893>
- Sidhu, P. K., & Nehra, K. (2017). Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.007>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Sjöström, M., Wold, S., Wieslander, A., & Rilfors, L. (1987). Signal peptide amino acid sequences in Escherichia coli contain information related to final protein localization. A multivariate data analysis. *The EMBO Journal*, 6(3), 823–831. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1987.TB04825.X>
- Sleight, S. C., Bartley, B. A., Lieviant, J. A., & Sauro, H. M. (2010). In-fusion

- biobrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Research*.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq179>
- Sugrue, I., O'Connor, P. M., Hill, C., Stanton, C., & Paul Ross, R. (2020). Actinomyces produces defensin-like bacteriocins (actifensins) with a highly degenerate structure and broad antimicrobial activity. *Journal of Bacteriology*.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00529-19>
- Taneja, N., & Sharma, M. (2019). Antimicrobial resistance in the environment: The Indian scenario. *Indian Journal of Medical Research*.  
[https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_331\\_18](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_331_18)
- Taylor, P. W., Stapleton, P. D., & Paul Luzio, J. (2002). New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery Today*, 7(21), 1086–1091.  
[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02498-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02498-4)
- Tenover, F. C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L. K., Carey, R. B., Limbago, B., ... Gorwitz, R. (2008). Characterization of Staphylococcus aureus isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 2837–2841.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00480-08>
- The World Bank. (2016). By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis. Recuperado el 30 de enero de 2020, de <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>
- Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2016). Expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with a small metal-binding protein from Nitrosomonas europaea. *Protein Expression and Purification*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.10.009>
- Vazquez-Rodriguez, A., Vasto-Anzaldo, X. G., Barboza Perez, D., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., García-Rivas, G., ... Morones-Ramirez, J. R. (2018). Microbial Competition of Rhodotorula mucilaginosa UANL-001L and E.



coli increase biosynthesis of Non-Toxic Exopolysaccharide with Applications as a Wide-Spectrum Antimicrobial. *Scientific Reports*, 8(1), 798. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17908-8>

Velázquez-Acosta, C., Cornejo-Juárez, P., & Volkow-Fernández, P. (2018). Cepas E-ESKAPE multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. *Salud Pública de México*, 60(2,mar-abr), 151–157. Recuperado de <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/8767/11560>

Velazquez-Meza, M E, Aires de Sousa, M., Echaniz-Aviles, G., Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, G., Silva-Sanchez, J., & de Lencastre, H. (2004). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3877–3880. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3877-3880.2004>

Velazquez-Meza, María E., Ayala-Gaytán, J., Carnalla-Barajas, M. N., Soto-Noguerón, A., Guajardo-Lara, C. E., & Echaniz-Aviles, G. (2011, agosto). First report of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/JCM.00533-11>

Ventola, C. lee. (2015). Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *P&T*. <https://doi.org/10.24911/ijmdc.51-1549060699>

Viçosa, G. N., Botta, C., Ferrocino, I., Bertolino, M., Ventura, M., Nero, L. A., & Cocolin, L. (2018). *Staphylococcus aureus* undergoes major transcriptional reorganization during growth with *Enterococcus faecalis* in milk. *Food Microbiology*, 73, 17–28. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.01.007>

Wang, B., & Muir, T. W. (2016). Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chemical Biology*, 23(2), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.004>

Wang, B., Zhao, A., Novick, R. P., & Muir, T. W. (2015). Key driving forces in the biosynthesis of autoinducing peptides required for staphylococcal virulence.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10679–10684.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1506030112>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious diseases*, 5(12), 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wheeler, D. L., Church, D. M., Federhen, S., Lash, A. E., Madden, T. L., Pontius, J. U., ... Wagner, L. (2003). Database resources of the national center for biotechnology. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg033>
- Wong, C. B., Khoo, B. Y., Sasidharan, S., Piyawattanametha, W., Kim, S. H., Khemthongcharoen, N., ... Liong, M. T. (2015). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by crude and fractionated extract from lactic acid bacteria. *Beneficial Microbes*, 6(1), 129–139. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0021>
- World Health Organization. (2017). Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. *World Health Organization*. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2019a). *2019 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline*. Recuperado de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000193>
- World Health Organization. (2019b). New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. Recuperado el 14 de enero de 2020, de <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent->

- Yang, M., Galiii, A., & Henner, D. (1983). Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 11(2), 1–2. <https://doi.org/10.1093/nar/16.5.2269>
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42), 14713–14718. <https://doi.org/10.1021/bi980809c>
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., ... Sonomoto, K. (2009). Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 538–541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01827-08>
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., & Sonomoto, K. (2009). Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3211–3217. <https://doi.org/10.1128/AAC.00209-09>
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., & Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1068539>
- Zeng, X., Liu, K., Xie, F., Zhang, Y., Qiao, L., Dai, C., ... Xu, D. (2013). A Simulation of Synthetic agr System in *E. coli*. En *9th International Symposium, ISBRA 2013* (pp. 76–86).
- Zhang, L., Yang, D., Wang, Q., Yuan, Z., Wu, H., Pei, D., ... Zhao, J. (2015). A defensin from clam *Venerupis philippinarum*: Molecular characterization, localization, antibacterial activity, and mechanism of action. *Developmental & Comparative Immunology*, 51(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2015.02.009>

